

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělství - Rostlinolékařství

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Přenos rostlinných virů mšicemi

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Miroslav Holley, DiS.

České Budějovice, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou - ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 21. 4. 2017

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D., za odborné vedení při práci v laboratoři, trpělivost a cenné rady. Poděkování také patří Hedvice Jakubíkové za pomoc a obrovskou podporu.

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na přenos rostlinných virů mšicemi. Mšice jsou celosvětově nejrozšířenějším a nejzásadnějším přenašečem rostlinných virů. Způsobují značné ztráty na výnosech zemědělských plodin i ovocných dřevin.

Cílem práce je ověření přítomnosti viru v hmyzím vektoru. Izolovaná virová RNA byla použita pro reverzní transkripci k syntéze cDNA (complementary DNA). Získaná cDNA sloužila jako templátové vlákno pro PCR. Na základě výsledku PCR byl detekován virus šarky v mšici švestkové (*Hyalopterus pruni*).

Klíčová slova: přenos rostlinných virů; perzistentní přenos; neperzistentní přenos; vektor; mšice

Abstract

The bachelor thesis is focused on transmission of plant viruses by aphids. Aphids are the most wide-spread and the most important vectors of plant viruses. They cause considerable yield losses of crops and fruit trees.

The aim of the thesis is to verify the presence of the virus in the aphid vector. Isolated RNA was used for reverse transcription for the synthesis of cDNA (complementary DNA). Acquired cDNA served as a template strain for PCR. The result of PCR method confirmed the presence of Plum pox virus in *Hyalopterus pruni*.

Key words: transmission of plant viruses; persistent transmission; non-persistent transmission; vector; aphid

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2. 1 Taxonomie a rozšíření mšic	7
2. 2 Morfologie mšic	7
2. 3 Bionomie mšic	8
2. 4 Význam a škody způsobené mšicemi	9
2. 5 Přenos viru mšicemi	11
2. 5. 1 Ústní ústrojí mšic	11
2. 6 Způsoby přenosu viru	12
2. 6. 1 Perzistentní přenos viru	13
2. 6. 1. 1 Perzistentní propagativní přenos	14
2. 6. 1. 2 Perzistentní nepropagativní přenos	15
2. 6. 2 Semiperzistentní přenos	16
2. 6. 3 Neperzistentní přenos	17
2. 7 Vliv rostlinných virů na chování přenašečů	18
3 CÍLE PRÁCE	19
4 MATERIÁL A METODIKA	20
4. 1 Odběr vzorků mšic	20
4. 2 Izolace RNA	20
4. 3 Reverzní transkripce	21
4. 4 Polymerázová řetězová reakce – PCR	22
5. 5 Agarózová elektroforéza	23
5 VÝSLEDKY	24
6 DISKUZE	25
7 ZÁVĚR	27
8 SEZNAM LITERATURY	28

1 ÚVOD

Viry jako patogenní agens mohou být přenášeny hád'átky, roztoči, infikovaným osivem, či může dojít k transportu virů pomocí roubování nebo očkování. K nejdůležitějším způsobům přenosu fytopatogenních virů v přírodě patří přenos hmyzími vektory. Přenášet viry mohou druhy hmyzu s kousacím ústním ústrojím, jako například brouci, housenky nebo larvy dvoukřídlých. Nejčastějšími přenašeči rostlinných virů jsou však druhy s bodavě sacím ústrojím, a to hlavně třásněnky, křisi, molice, ploštice, červci, štítenky a největší skupinu tvořící mšice.

Mšice jsou nejznámějším a nejrozšířenějším hostitelem a přenašečem rostlinných virů ze všech hmyzích škůdců. Mohou přenášet desítky až stovky virů, a tím negativně ovlivňují velké množství rostlin. Výskyt některých druhů mšic byl prokázán až na tisíci různých druzích rostlin. Při sání rostlinných tekutin získávají mšice viry, a ty se v závislosti na způsobu množení ve vektoru dělí buď na perzistentně nebo neperzistentně přenášené viry.

Mšice jsou schopny tvořit velké kolonie s mnoha generacemi za rok. Tento jev značně zvyšuje efektivitu a rychlost přenosu virů. V zemědělství působí mšice největší škody na kulturních plodinách a v ovocných sadech. Viry přenášené mšicemi mohou způsobovat např. virové žloutenky a mozaiky cukrové řepy, zakrslost ječmene, přenášejí virózy bramboru, tabáku, zeleniny, košťálovin, obilnin atd. U ovocných stromů z rodu *Prunus* přenášejí virus způsobující karanténní chorobu, šarku peckovin.

V současné době existuje mnoho způsobů ochrany rostlin proti mšicím, ať už je to chemická či biologická ochrana, nebo šlechtění na resistenci proti virovým chorobám způsobenými právě tímto škodlivým hmyzem. I přes všechno, co dnes víme, zůstává mnoho věcí neprobádaných a potrvá ještě dlouhou dobu, než se zefektivní boj proti těmto významným zemědělským škůdcům.

Bakalářská práce shrnuje současný stav vědeckých poznatků o přenosu rostlinných virů mšicemi. V praktické části bude otestována metodika identifikace viru ve hmyzím vektoru.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Taxonomie a rozšíření mšic

Mšice jsou drobný hmyz pařící do čeledi Aphididae (mšicovití). Tato čeleď je dále řazena do nadčeledi Aphidoidea (mšice) v řádu Hemiptera (polokřídlí). Představují hlavní škůdce zemědělských plodin. Poškozují rostliny přenosem virových onemocnění při sání rostlinných tekutin (Ogawa a Miuru, 2014).

V rámci nadčeledi Aphidoidea (mšice) bylo popsáno více než 4 700 druhů. Někteří autoři řadí všechny zástupce nadčeledi Aphidoidea pouze do jedné čeledi, zatímco někteří je rozčleňují až do 11 dílčích čeledí. Jednotliví příslušníci Aphidoidea jsou charakterizováni podle jejich životních cyklů, ve kterých mohou střídát taxonomicky odlišné hostitelské rostliny. Mšice je možno nalézt na listech, výhoncích nebo pupenech. Některé žijí i v poněkud zvláštních prostředích, například v rozkládajícím se rostlinném materiálu nebo na zemi v úkrytu postaveném mravenci, s nimiž jsou asociovány. Převážná část druhů mšic je v různých generacích polymorfní a mohou se množit různými způsoby (Gillott, 2005).

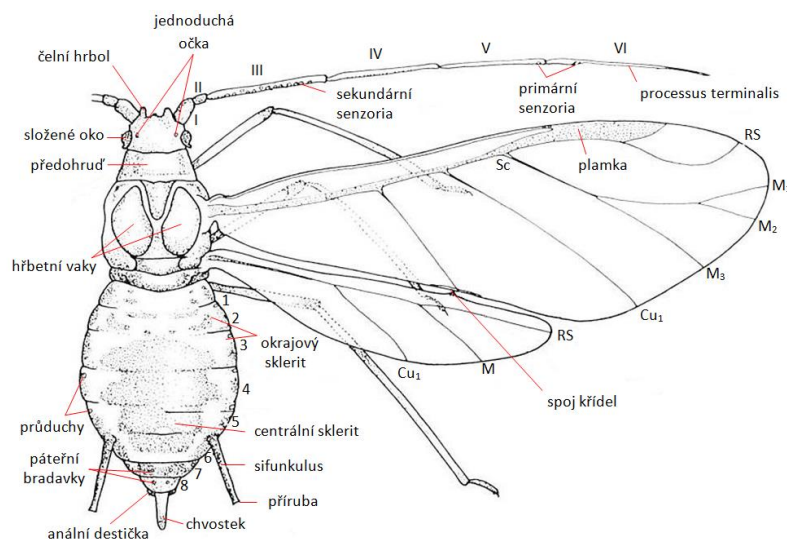
V České republice se vyskytuje přibližně 680 druhů mšic. Zhruba 60 druhů k nám bylo zavlečeno z jiných částí světa. Škody na polních plodinách na našem území způsobuje přibližně 50 druhů mšic (Fryč a Rychlý, 2015).

2.2 Morfologie mšic

Mšice dosahují rozměrů od 0,2 do 8 mm. Tělo (obr. 1) je měkké, málo sklerotizované a protáhlé, některé druhy mohou mít tělo zploštělé. Mají nepohyblivou hypognátní hlavu, přirostlou k předohrudí. Ústní ústrojí je bodavě sací. Délka chobotu (rostrum) se u jednotlivých druhů liší. Nitkovitá tykadla se skládají z 3 – 6 článků a jsou na nich umístěny čichové receptory (senzoria, rhinaria). Na 5. nebo 6. článku zadečku vyrůstají u většiny mšic sifunkuly. Tělo je zakončeno chvostkem (caudo), který je zároveň posledním zadečkovým článkem.

Blanitá křídla s podélnou žilnatinou a plamkou (stigma) bývají bezbarvá, ale možné jsou i výjimky. Přední křídla jsou větší než zadní a u okřídlených forem jsou skládány střechovitě. Častěji se však vyskytují bezkřídlí jedinci. Na těle vyrůstají štětiny nebo chloupky různých tvarů, různého počtu a velikosti (Fryč, 2015).

Některé druhy produkují ve speciálních žlázách voskovitě bílá vlákna. Jako příklad lze uvést vlnatku krvavou (*Eriosoma lanigerum*). Nejčastější zbarvení mšic je zelené a černé, nicméně mohou se vyskytovat i šedě, hnědě, růžově, červeně či žlutě zbarvené varianty (Day a Spring, 2002).



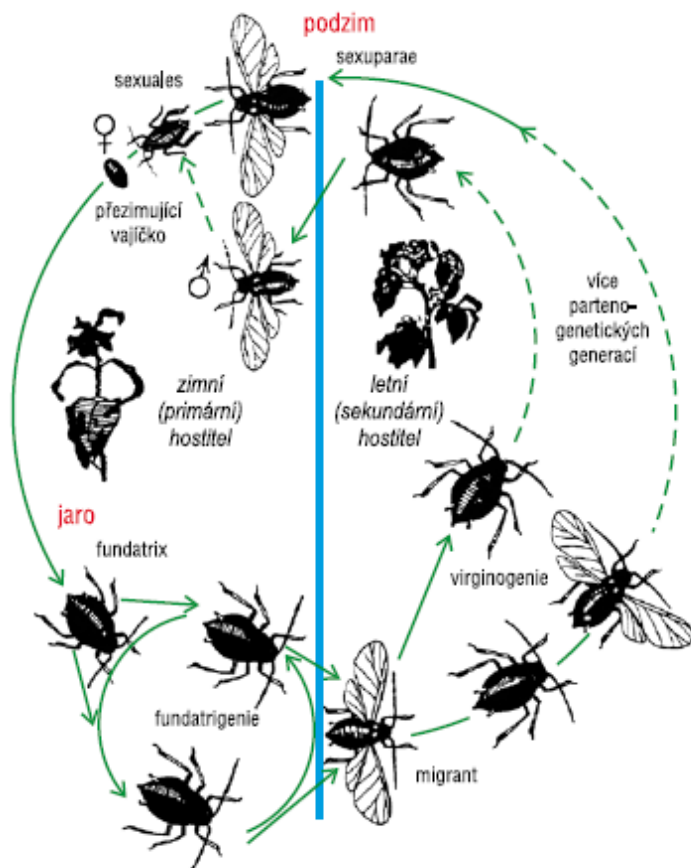
Obr. 1: Dorzální pohled na okřídlenou samičku (Fryč, 2015).

2. 3 Bionomie mšic

Mšice se mohou rychle reprodukovat pomocí jedinečné a komplexní strategie. Obvykle přezimují vajíčka (obr. 2), ze kterých se na jaře líhnou samičky tzv. zakladatelky (fundatrix). Tyto samičky poté prostřednictvím partenogeneze (z neoplozených vajíček) zakládají novou generaci, v podstatě se klonují bez páření. Jednou ze strategií k rozmnožování je také tzv. „skrytá generace“ (telescoping generations). Jedná se o mladé nymfy, které již uvnitř mateřského samičího těla nesou vajíčka pro novou generaci. Výše zmíněné vlastnosti umožňují mšicím rychlé namnožení do vysoké populační hustoty během vegetačního období (Warren a Schalau, 2014).

První generace mšic jsou bezkřídle. Teprve když se kolonie začne rozrůstat a shlukovat, mohou být produkovány okřídlené formy. Okřídlené formy se stěhují na nové hostitelské rostliny, kde znovu začínají vytvářet kolonie. Z těchto generací tak vzniká obrovské množství populací v průběhu celého léta (Klass, 2012). U mnoha druhů mšic se také mohou za teplého počasí vyvinout standardně se rozmnožující

jedinci přímo z nově narozených nymf. Tento proces trvá přibližně 7 až 8 dní. Během několika dalších týdnů tak může jedna samice vyprodukovat až 80 potomků. Populace mšic se tak zvyšuje velkou rychlostí (Flint, 2013).



Obr. 2: Schéma vývoje dicyklických (hostitele měnicích) mšic v průběhu roku (Šefrová, 2006).

Na konci podzimního období samičky plodí jednu generaci obou pohlaví. Pohlavním rozmnožováním jsou produkována vajíčka, která přezimují. Z těchto vajíček se na jaře vylíhnou samičky, nakladou vajíčka a umírají. Celý tento cyklus se každoročně opakuje (Sutherland, 2006).

2. 4 Význam a škody způsobené mšicemi

Většina mšic poškozují hostitelské rostliny sáním. Při krmení nabodávají rostlinu a injekčním způsobem mohou pomocí sekrece slin přenášet rostlinám nebezpečné viry. Infikované rostliny zakrňují, deformují se listy a plody nebo

vznikají hálky na listech, stopce a dokonce i kořenech. Mšice také vylučují lepkavou látku obsahující cukr známou, jako „medovice“. Medovice může pokrývat listy, větvičky a plody rostlin. Později se na tomto substrátu, bohatém na sacharidy, vytvoří černý plísňový povlak, který snižuje funkci fotosyntetického aparátu (Hoover, 2004). Černé zbarvení pak působí nevzhledně a ve spojení s medovicí snižuje kvalitu tržní produkce ovoce a zeleniny (Klass, 2012).

4000 druhů mšic mírného pásu kolonizuje přibližně 25 % všech druhů rostlin. Navíc téměř 50 % hmyzem přenosných virů (275 z 600) je transportováno právě mšicemi. Hill (1987) ve své analýze uvádí, že ze 45 nejvýznamnějších škůdců 6 hlavních polních plodin mírného pásu (kukuřice, pšenice, brambory, cukrová řepa, pšenice, rajčata) tvoří 26 % právě mšice (tab. 1).

Tab. 1: Vybrané druhy mšic a choroby které způsobují

Vektor - česky	Vektor - latinsky	Plodina	Choroba
Mšice zelná	<i>Brevicoryne brassicae</i>	Řepka	Virus západní žloutenky řepy (BWYV)
Mšice střemchová	<i>Rhopalosiphum padi</i>	Ječmen	Virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV)
Mšice maková	<i>Aphis fabae</i>	Cukrová řepa	Virus žloutenky řepy (BYV)
Mšice řešetláková	<i>Aphis nasturtii</i>	Brambor	S-viróza bramboru (SVY)
Mšice slívová	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Slivoň švestka	Šarka švestky (PPV)
Mšice broskvoňová	<i>Myzus persicae</i>	Brambor	Virová svinutka bramboru (PLRV)
Kyjatka zahradní	<i>Macrosiphus euphorbiae</i>	Brambor	M-viróza bramboru (PVM)
Mšice chmelová	<i>Phorodon humuli</i>	Brambor	Y-viróza bramboru (PVY)
Kyjatka hrachová	<i>Acyrtosiphum pisum</i>	Vojtěška	Virus mozaiky vojtěšky (AMV)

Zdroj: Rostlinolékařský portál, <http://eagri.cz>

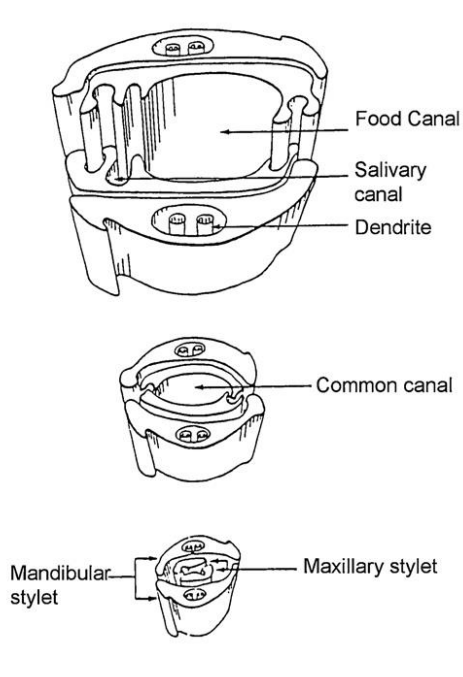
V Evropě škodlivým působením mšic vznikají průměrné roční ztráty 700 000 tun na výnosech pšenice a 850 000 tun na bramborách. U cukrové řepy jsou ztráty největší. Mohou se blížit až ke 2 000 000 tun (Dedryver et al., 2010), jelikož se zde vyskytuje virus žloutenky řepy, který způsobuje pokles výnosu o 50 % a virus mírného žloutnutí řepy, u nějž se ztráty pohybují okolo 35 %. Tyto viry jsou přenášeny dvěma hlavními druhy mšic: mšicí makovou (*Aphis fabae*) a mšicí broskvoňovou (*Myzus persicae*) (Albittar et al., 2016).

Pro plodiny mírného pásu mají mšice nesporně větší hospodářský význam. Jejich zastoupení je zde o mnoho vyšší než v tropických či subtropických pásmech. Například pro rýži jsou mšice pouze drobnými škůdci (Dedryver et al., 2010).

2. 5 Přenos viru mšicemi

2. 5. 1 Ústní ústrojí mšic

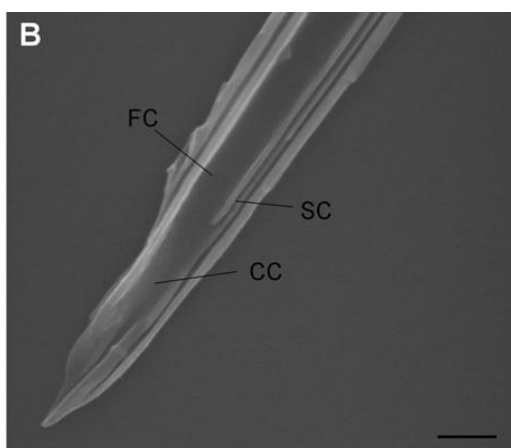
Jak již bylo zmíněno, mšice jsou hmyz s bodavě - sacím ústním ústrojím. Hlavní částí tohoto typu ústního ústrojí je stilet, na který ze svrchní strany přiléhá horní pysk (labrum), ze strany spodní je celý stilet kryt spodním pyskem (labium). Labrum je trojúhelníkovitého tvaru a pokrývá celou základnu stiletu. Labium je trubkovitý orgán tvořený komplexní svalovinou, která umožňuje zužování a zkracování stiletu při jeho zavádění do rostliny. V drážce, která probíhá po celé délce přední strany labia, je pak celý stilet uložen (Uzest et al., 2010).



Obr. 3: Schématické znázornění distální části stiletu (Braulat et al., 2010).

Samotný stilet se skládá ze dvou vnějších mandibulárních stiletů, které obklopují dva vnitřní maxilární stiletu (obr. 3). Všechny čtyři stiletu mají tvar jehlic dlouhých 400-700 mikronů a jsou tvořeny kutikulárními strukturami. Mandibulární

stiletý mají funkci „pronikající“ a „vodící“. Při nabodnutí vedou maxiliární stiletý směrem k hlubším tkáním. Maxiliární stiletý jsou výrazně namířeny na dolní končetiny a mají složitou vnitřní strukturu. Po celé délce vnitřní strany těchto stiletů jsou podélné rýhy a drážky, které mohou být zavřeny pomocí komplexních zámkových struktur, tzv. „ziplock“ způsobem. Jakmile je stilet uzavřen, kanálky vedoucí k velkému potravnímu a malému slinnému kanálku zůstanou prázdné. Potravní a slinné kanálky probíhají celým stiletem odděleně, spojují se až v jeho distální části (obr. 4). Vnitřní plochy obou maxiliárních stiletů jsou asymetrické. Slinný kanálek je pouze v jednom ze dvou stiletů, druhý je uzavřen pomocí rýhy (Brault et al., 2010).



Obr. 4: Maxiliární špička stiletu. Potravní kanálek (FC), slinný kanálek (SC), společný kanálek (CC) (Brault et al., 2010).

2. 6 Způsoby přenosu viru

Mšice jsou již dlouhou dobu předmětem intenzivního vědeckého výzkumu. Je to dáno zejména tím, že mají komplexní životní cyklus se střídající se asexuální a sexuální generací a vykazují pozoruhodnou fenotypovou plasticitu. Dalším důvodem zkoumání mšic je nepochybně fakt, že jsou zdaleka nejčastějším vektorem rostlinných virů. V závislosti na jednotlivých druzích virů a rozdílných vlastnostech mšic byly zaznamenány různé modely interakcí mezi mšicí a virem.

Rozlišení způsobů interakce mezi různými druhy virů a vektorů bylo provedeno na základě měření časových úseků potřebných pro získání viru z infikované rostliny a jeho naočkování do nového zdravého hostitele. Stejně tak byla měřena i doba, po kterou zůstal virus ve vektoru infekční (tab. 2). Na základě získaných výsledků byly definovány tři hlavní způsoby přenosu (Brault et al., 2010)

virů: neperzistentní (non-persistent), semiperzistentní (semi-persistent) a perzistentní (persistent) přenos.

Tab. 2: Způsoby přenosu rostlinných virů (Brault et al., 2010).

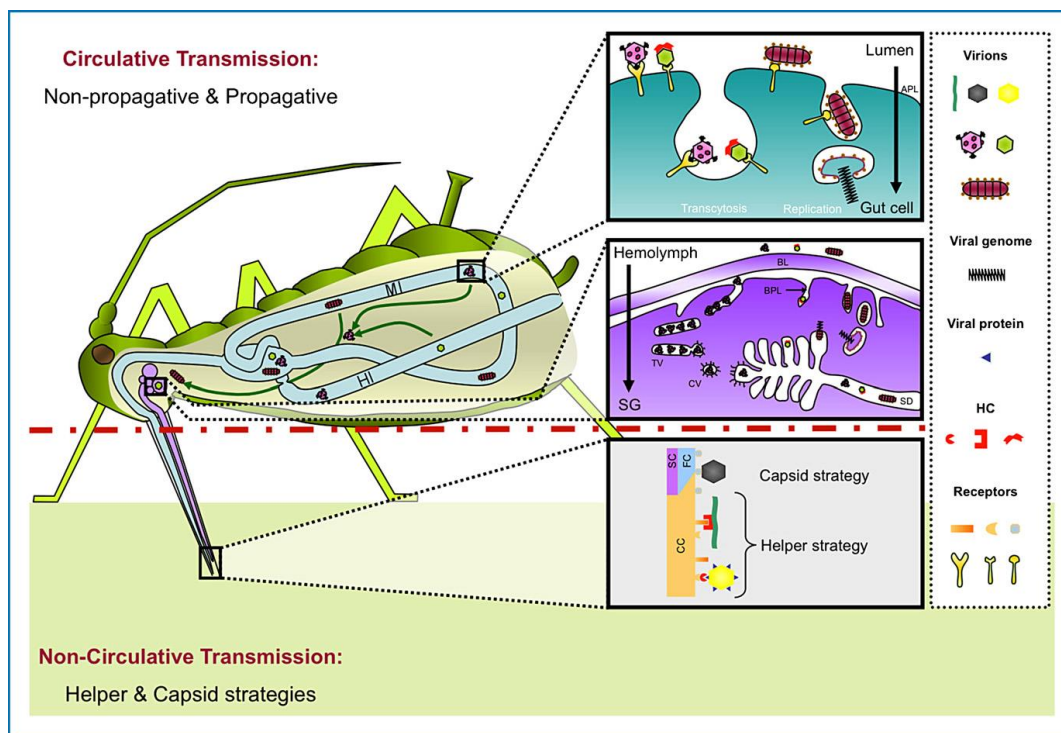
Způsob přenosu	Cirkulativní		Necirkulativní	
	Propagativní	Nepropagativní	Neperzistentní	Semiperzistentní
Doba pro získání viru	Minuty až hodiny	Minuty až hodiny	Sekundy až minuty	Sekundy až hodiny
Doba přetrvání ve vektoru	Dny až měsíce	Dny až měsíce	Sekundy až minuty	Minuty až hodiny
Doba potřebná k přenosu	Minuty až hodiny	Minuty až hodiny	Sekundy až minuty	Sekundy až hodiny
Spojení s vektorem	Vnější	Vnitřní	Vnější	Vnější
Replikace ve vektoru	Ano	Ne	Ne	Ne
Potřeba HC	Ne	Ne	Ano i ne	Ano i ne

2. 6. 1 Perzistentní přenos viru

Do kategorie perzistentního neboli cirkulativního přenosu patří viry, které část svého životního cyklu stráví v těle přenašeče (obr. 5). Při perzistentním přenosu prochází požitý virus střevním epitelem střední nebo distální částí trávicího traktu a následně je uvolňován do hemolymfy. Odsud se mohou některé druhy virů přemístit až do různých orgánů, včetně orgánů reprodukčních a jsou tak dále přenášeny na potomky mšice.

Z hemolymfy se musí viry dostat do slinných žláz a poté do slin. Teprve ty jsou naočkovány do zdravého hostitele a je tak zahájena nová infekce. U rostlinných virů označujeme tento časový úsek, tedy dobu potřebnou k dokončení výše popsaného cyklu, jako inkubační dobu či latentní období. Délka latentního období se pohybuje od několika hodin do několika dní. Konkrétní časové rozpětí je dáno tím, jak dlouho virus setrvá v těle vektora (kterými orgány se pohybuje) nebo může být ovlivněno různými fyzikálními faktory, například teplotou. Většina perzistentně přenášených virů přetrvává v těle hmyzu až do konce jeho života (Brault et al., 2010).

Příkladem perzistentně přenášených virů jsou rody *Enamovirus*, *Luteovirus*, *Polerovirus*, *Umbravirus* z čeledi *Luteoviridae*.



Obr. 5: Modely perzistentního a neperzistentního přenosu viru v mšici (Brault et al., 2010).

Perzistentně přenášené viry mají velmi malý vliv na fyziologii hmyzu. Přítomnost v těle však může být velmi dobře detekována imunitním systémem, tudíž není možné přímý vliv viru na kondici a chování mšic úplně vyloučit (Gutiérrez et al., 2013).

V rámci perzistentního způsobu přenosu virů mohou být ještě vyčleněny dva odlišné principy interakce. Cirkulativní nepropagativní přenos a přenos cirkulativní propagativní (Dietzgen et al., 2016).

2. 6. 1. 1 Perzistentní propagativní přenos

Propagativní viry se liší od nepropagativních tím, že se virus replikuje ve vektoru (Stafford et al., 2012). Jinak jsou v mnoha aspektech podobné jako je získání nebo cesta pohybu viru v rámci přenašeče.

Hlavní rozdíl však je, že jakmile je mšice infikována, vir zůstane po zbytek života ve vektoru. Virus může být přenášen na potomstvo prostřednictvím transovariálního přenosu. To znamená že se virus dostane do vajíček a pak i do další generace.

U propagativních rostlinných virů byla pozorována jistá podobnost se živočišnými viry přenášenými komáry. V obou případech virus do mšice vstupuje přes slinné žlázy a replikuje se přímo v těle (Ng a Perry, 2004). S tím souvisí i fakt,

že jsou mšice, které transportují rostlinné viry propagativní cestou, striktně omezeny pouze na čeled' *Rhabdoviridae*, která zahrnuje viry schopné způsobovat onemocnění jak u savců, tak u rostlin.

Přesně je možné způsob přenosu rhabdovirů hmyzem označit jako horizontální perzistentní propagativní, což znamená, že virus se musí replikovat ve vektoru ještě před přenosem na hostitele. Úspěšné dokončení transportu viru k cílovém hostiteli je podmíněno několika skutečnostmi. Předně je vyžadována interakce hmyzu a různých virových faktorů. Virus musí být také zachycen v takovém přenašeči, který jej přenesení ke správnému kompatibilnímu hostiteli, tedy k rostlinám (u rostlinných virů) nebo obratlovcům (u virů živočišných). Nutnost průchodu viru střevem hmyzu se může v rámci celého procesu přenosu jevit jako komplikace, nicméně přechodem viru přes střevní stěnu do hemolymfy je zvýšena účinnost celého transportu a také je umožněno přenášení rhabdovirů jinými vektory, než těmi pro tuto čeled' specifickými. Přítomnost viru v organismu vektoru však nemusí nutně znamenat, že bude k hostiteli přenesen. Například *Sowthistle yellow vein virus* (SYVV) se nachází v různých tkáních nevektorů (hmyz, který virus nepřenáší a není typicky primární přenašeč) ale není přítomen ve slinných žlázách, tudíž nemůže být inokulován do rostliny. V jiných nevektorech se virus hromadí právě ve slinných žlázách, ale přenášen není (Hogenhout et al., 2003).

2. 6. 1. 2 Perzistentní nepropagativní přenos

Viry, patřící do čeledi *Luteoviridae*, *Nanoviridae* a *Geminiviridae*, jsou přenášený obligátním „nepropagativním“ způsobem. Termín nepropagativní je uveden v uvozovkách, protože není zatím zcela známo, zda se některé či všechny tyto viry mohou replikovat v hmyzím vektoru. Nicméně je zřejmé, že se žádný doposud studovaný virus z těchto čeledí nemůže namnožit natolik efektivně, aby bylo možné hmyz označit jako reproduktivního hostitele virů (Gray et al., 2014). Vektoři jsou schopni virus přenášet v podstatě po celý svůj život, ale protože se virus v těle hmyzu nereplikuje, je intenzita přenosu postupně snižována (Whitfield a Rotenberg, 2015). Některé studie jednoznačně prokazují, že účinnost přenosu nanovirů, luteovirů a geminivirů mšicemi a molicemi úzce souvisí s teplotou, avšak zásadní mechanismy byly doposud jen málo prozkoumány (Blanc a Michalakis, 2016).

Interakce viru s hmyzem, a tedy i šíření v jeho organismu jsou nejlépe charakterizovány u přenosu luteovirů (Gray et al., 2014). Luteoviry jsou poměrně malé, jednoduché dvacetistěnné viriony, které do mšice vstoupí tehdy, když se živí floémem infikované rostliny, tedy přes zažívací trakt (Reinbold et al., 2003). Z ústního ústrojí je virus transportován do střeva, kde pomocí endocytózy proniká až do střevního epitelu. Váček obsahující virus se pak spojí s plazmatickou membránou. Tím je virus uvolněn, snadno prochází bazální membránou do hemocoelu a je dále transportován do příslušných slinných žláz (Liu et al., 2006). Odtud je pak vstříkován do nové rostliny během krmení. Přestože není virus v přenašeči replikován, může být infekční několik dní nebo v některých případech i po celý život (Sicard et al., 2016).

2. 6. 2 Semiperzistentní přenos

Viry přenášené mšicemi semiperzistentním způsobem se vyskytují v pěti rodech: *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus*, *Waikavirus* (Nault, 1997). Pravděpodobně nejlépe charakterizovanými semiperzistentně přenášenými viry jsou rody *Caulimovirus* a *Closterovirus* (Ng a Perry, 2004).

Získávání viru je záležitostí několika minut, účinnost virových částic se však může zvyšovat v závislosti na délce procesu krmení mšice (Palacios et al., 2002). Virus může být v mšici uchován po dobu několika hodin až dnů. Stejně jako u neperzistentního přenosu nepotřebují viry latentní období, tedy nejsou přítomny v hemolymfě a ani nemohou být přeneseny do tělní dutiny (hemocoelu) (Katis et al., 2007).

Virus je efektivněji získáván, když mšice saje, než když přelétává z rostliny na rostlinu a zkusmo nabodává rostlinná pletiva. Zachycení viru z hostitelské rostliny se děje prostřednictvím mechanismů spojených s virovým CP (Capsid protein). Virus je umístěn v chitinových lamelách stiletu (Ng a Zhou, 2015). Takovým mšicemi semiperzistentně přenášeným virem je například virus mozaiky kvěťáku (CaMV), který byl na počátku řazen do skupiny virů transportovaných neperzistentně (Raccach a Fereres, 2009).

Situace je však poněkud odlišná v případě, kdy jsou semiperzistentní viry přenášený mollicemi. Imunofluorescenční konfokální mikroskopie prokázala, že například *Crinivirus* Lettuce infectious yellow virus (LIYV) je uchováván v horní části trávicího traktu molice. LIYV viriony jsou tedy z molice na rostlinu přenášený pravděpodobně při vyvrhování potravy, ne jako u výše zmíněného CaMV, který je

do rostliny inokulován výměšky slinných žláz mšice. Tento rozdílný způsob introdukce viru do hostitele souvisí také s tím, že molice mají oddělené maxiliární stiletu od slinných kanálků (Dietzgen et al., 2016).

2. 6. 3 Neperzistentní přenos

Neperzistentní způsob přenosu virů je také jinak označován jako přenos necirkulativní. Do kategorie neperzistentně přenášených virů spadají následující rody: *Potyvirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Cucumovirus*, *Alfamovirus* a *Fabavirus*. Viry všech těchto rodů jsou přenášeny hlavně mšicemi, ale několik virů z rodu *Carlavirus* a z čeledi *Potyviridae* je přenášeno molicemi (Fereses, 2000).

Neperzistentní přenos rostlinných virů je však spíše typický pro mšice. Mšice si totiž volí rostlinu vhodnou ke krmení pomocí zkusmých nabodávání rostlinných pletiv. Jednotlivé náhodné vpichy mohou trvat pouze několik vteřin či minut.

Pro vysvětlení principu neperzistentního přenosu byly navrženy dvě hypotézy. První z nich je tzv. "stylet-borne" hypotéza (Kennedy et al., 1962). Podle ní jsou virové částice umístěny na špičce stiletu, tedy na vnějším nebo vnitřním povrchu distální části maxiliárního kanálku. Mšice by pak působila jako "létající jehla" - viriony jsou tedy mechanicky připojeny ke stiletu nebo od něj odpojeny při každém jednotlivém nabodnutí. Druhou navrženou teorií je tzv. "ingestion-egestion" hypotéza (Gamez a Watson, 1964), která mšice popisuje spíše jako "létající stříkačky". Předpokládá se totiž, že jsou viriony mšicí získávány tehdy, kdy při sání přijímá obsah buňky. Zdravá rostlina je pak naočkována později při procesu intracelulárního vyplavování. Tato "ingestion-egestion" hypotéza je stále považována za vhodnější pro vysvětlení problému neperzistentního způsobu přenosu virů (Martín et al., 1997).

V současné době je stále nejasné, zda by mělo být rozlišování mezi neperzistentním a semiperzistentním přenosem zachováno v kategorii neperzistentního přenosu. Je totiž zřejmé, že toto rozdělení nevykazuje žádné kvalitativní rozdíly v mechanismu vztahu mezi hmyzem a virem. Z toho důvodu (Pirone a Blanc 1996) navrhli vhodnější rozčlenění neperzistentního mechanismu transportu virů, které interakci viru a vektoru popisuje z molekulárního hlediska. Byly navrženy dvě odlišné strategie neperzistentního přenosu viru (obr. 5) a to "capsid strategy" a "helper strategy". V procesu "capsid strategy" virus interaguje s vektorem přes svůj obalový protein (CP). „Helper strategy“ představuje interakci

vektoru a viru, která je zprostředkována jiným, virem kódovaným nestrukturním proteinem, obecně označovaným jako "helper component" (HC) (Brault et al., 2010). Tento pomocný protein byl poprvé popsán u Potyvirů, později také u jiných, na stiletu přenášených virů, včetně Caulimovirů (Lung a Prione, 1974; Kassanis a Govier, 1971; Fereres a Moreno, 2009).

2.7 Vliv rostlinných virů na chování přenašečů

Virem způsobené biochemické a fyziologické změny v napadené rostlině ovlivňují hostitelské preference hmyzího vektoru (Mauck et al., 2014). Virem infikované rostliny jsou pak pro přenašeče atraktivnější než rostliny prosté nákazy. Viry si tak samy zajistí další šíření a také se prodlužuje délka života hmyzu (Pérez a Eigenbrode, 2011).

Rostliny infikované virem bronzovitosti rajčete (TSWV) byly pro třásněnku západní (*Frankliniella occidentalis*) přitažlivější, než nenapadené rostliny. Neinfikované samičky třásněnek pro krmení a stejně tak kladení vajíček zcela jasně upřednostňovaly virem infikované rostliny (Stafford et al., 2011).

U neperzistentně přenášeného viru mozaiky okurek (CMV) mají změny působené virem vliv na potlačení signální dráhy kyseliny jasmonové. Tato kyselina ovlivňuje proteiny nutné pro interakci mezi virem a vektorem, čímž se zvyšuje výkonnost a efektivita přenosu (Carmo-Sousa et al., 2014). U viru žluté svinutky listů rajčete (TYLCV), který patří do rodu *Geminivirus*, byl prokázán vliv na chování molice. Manipulace s tělem přenašeče, tak může zvýšit intenzitu přenosu viru (Liu et al., 2013).

Jsou však také známy případy, kdy snížená kvalita rostliny nevedla ke zvýšení rychlosti přenosu viru (Mauck et al., 2014). Luteoviry ovlivňují chování mšice naprosto opačným způsobem. Po získání luteoviru preferuje mšice zdravé rostliny, zatímco mšice nevirulentní má sklon dávat přednost napadeným rostlinám (Ingwell et al., 2012).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo analyzovat současný stav poznatků o přenosu rostlinných virů mšicemi ve formě literární rešerše. Dalším cílem bylo izolovat virus šarky peckovin (PPV) z hmyzího přenašeče. Výsledky byly formou diskuze porovnány s dříve publikovanými výsledky izolace fytopatogenních virů a viru PPV v hmyzích vektorech.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Odběr vzorků mšic

Vzorky mšice švestkové (*Hyalopterus pruni*) byly nasbírány v červnu roku 2016 v jižních Čechách u vesnice Dlouhá Ves. Konkrétní místo odběru, starý ovocný sad, se nachází vedle nové jabloňové výsadby za obcí na přesných souřadnicích 49°06'13.0"N 14°08'32.7"E.

Na stanovišti byly vybrány stromy slivoně švestky (*Prunus domestica*) s typickými příznaky napadení virem šarky (Plum pox virus, PPV). Z listů těchto stromů byly odebrány tři vzorky mšic do předem připravené zkumavky se stabilizačním roztokem RNALater Solution. Vzorky byly uchovány v mrazáku při -20 °C.

4.2 Izolace RNA

RNA byla extrahována metodou, jejímž základem je činidlo TRI Reagent. Výsledný izolát tvoří buď samotná celková RNA, nebo je v něm zastoupeno jak RNA, tak i DNA a proteiny. Všechny tyto složky lze získat i z malého množství tkáně. RNA je izolována neporušená, kontaminace hotového izolátu DNA a bílkovinou je minimální.

Postup:

1. Vzorky mšic byly vloženy do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Do zkumavky byl přidán 1 ml TRI Reagent předehřátý na 60 °C a celá suspenze byla homogenizátorem rozmělněna. Homogenizované vzorky byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě.

2. Homogenáty byly odstředěny při 3000 rpm 20 minut při 4 °C. Poté byl tekutý supernatant odpipetován do nových zkumavek a bylo přidáno 200 µl chloroformu, 15 sekund byly zkumavky míchány a 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě. Následně byly 15 minut centrifugovány při 12 000 rpm a 4 °C. Tento krok byl dvakrát opakován.

3. Supernatant byl převeden do nových zkumavek a bylo přidáno 500 μl 2 – propanolu a 500 μl 1,2 M NaCl. Vše bylo promícháno a inkubováno při laboratorní teplotě 10 minut. Poté následovalo odstředění při 12 000 rpm a 4 °C 10 minut.

4. Tekutý supernatant byl znovu odstraněn a pelet promyt přidáním 1000 μl 75 % ethanolu. Vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány 5 minut při 8 500 rpm a 4 °C. Tento krok byl znovu dvakrát opakován.

5. V termobloku byly zkumavky vysušeny a k peletu RNA bylo přidáno 20 μl DEPC – MQ water a 1 μl inhibitoru RNázy. Vzorky byly poté inkubovány v termostatu 10 minut při 60 °C

6. Vyizolovaná RNA byla uchována v mrazáku při – 80°C.

4.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při které dochází k přepisu genetické informace z RNA do DNA. Je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou, kterou můžeme najít u mnoha retrovirů. K amplifikaci RNA se používá RT – PCR, což je modifikace klasické PCR metody. V konečném výsledku získáme z RNA molekulu DNA označovanou jako cDNA, která je komplementární s původní RNA.

Postup:

1. Do mikrozkušavky byla nejprve připravena směs 6 μl nuklease free H₂O a 3 μl oligo (dT) 15 primeru. Tato směs byla rozpipetována do tří zkumavek po 3 μl a následně byly přidány do každé zkumavky 3 μl vyizolované RNA. Připravené vzorky byly vloženy do termocykleru na 5 minut při teplotě 70 °C.

2. Do nové zkumavky byla připravena reakční směs, která se připravovala za stálého chlazení (tab. 3).

Tab. 3: Složení reakční směsi

Složky reakční směsi	Množství (μl)
Nuclease free H ₂ O	6,6
dNTP	1
5x RxN pufr	4
MgCl ₂	2,4
RT enzym	1
	15

3. Reakční směs byla promíchána a rozpipetována po 15 µl do všech tří zkumavek s RNA. Vzorky byly vloženy do termocykleru na 60 minut při 42 °C, kde proběhla reverzní transkripce. Výsledné vzorky s cDNA byly použity pro PCR.

4.4 Polymerázová řetězová reakce – PCR

Metoda PCR slouží k mnohonásobné amplifikaci specifického úseku DNA. Amplifikovaný úsek DNA je na obou koncích ohraničen primery, předním tzv. „forward“ primer a zadním tzv. „reverse“ primer. Tyto primery jsou komplementární k 3' a 5' konci daného úseku. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, která syntetizuje nové vlákno DNA.

Pro amplifikaci DNA byly použity specifické primery P1 a P2 pro detekci viru šarky o velikosti ampliconu 243 bp (Wetzell et al., 1991).

Tab. 4: Seznam použitých primerů

Primer (243 bp)	Sekvence primeru
P1 (Reverse)	5'-ACCGAGACCACTACACTCCC-3'
P2 (Forward)	5'-CAGACTACAGCCTCGCCAGA-3'

Postup:

1. Do zkumavky byla připravena reakční směs složená z Nuclease free H₂O, PPP master mixu, specifických primerů a 1 µl templátu cDNA.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR

Složky reakční směsi	Množství (µl)
PPP Master mix	10
Primer 1	0,5
Primer 2	0,5
Nuclease free H ₂ O	8
cDNA	1

2. Zkumavky obsahující 19 µl reakční směsi a 1 µl cDNA byly vloženy do termocykleru. Každá reakce mimo úvodní denaturaci a závěrečnou elongaci probíhala ve 40 opakování v tomto pořadí: úvodní denaturace při 94 °C po dobu 2 minut, denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, annealing při 60 °C po dobu 30 sekund, elongace při 72 °C po dobu 72 minut a závěrečná elongace při 70 °C po dobu 10 minut.

3. Po ukončení PCR reakce byly výsledné vzorky uloženy v lednici při 4 °C.

5.5 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza patří mezi separační techniky sloužící k analýze proteinů a nukleových kyselin a vizualizaci separovaných fragmentů. Princip metody je v pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli. Nositelem záporného náboje v molekule DNA jsou především fosfátové skupiny, které v elektrickém poli směřují ke kladnému náboji (anodě).

Postup:

1. Na předvážkách byly v Erlenmayerově baňce naváženy 2 gramy 2 % agarózy a bylo přidáno 100 ml 1x TBE pufru. Takto připravená směs byla promíchána a vložena do mikrovlnné trouby.

2. Po rozpuštění agarózy byla směs ochlazena. Do směsi bylo přidáno 4,5 μ l ethidium bromidu a gel byl vylit do formy s vaničkou a hřebenem.

3. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyndán a vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany, tak aby jamky po hřebínku byly u záporného pólu. Vana byla poté zalita TBE pufrem.

4. Do první a poslední jamky bylo napipetováno 15 μ l velikostního markeru (Ladder 100 bp), který slouží pro porovnání velikosti separovaných DNA fragmentů.

5. Do dalších jamek bylo napipetováno 15 μ l vzorků z PCR reakce s amplifikovanou cDNA.

6. Elektroforéza probíhala 90 minut při napětí 90 V.

7. Po skončení elektroforézy byly výsledky pozorovány pomocí UV – transluminátoru.

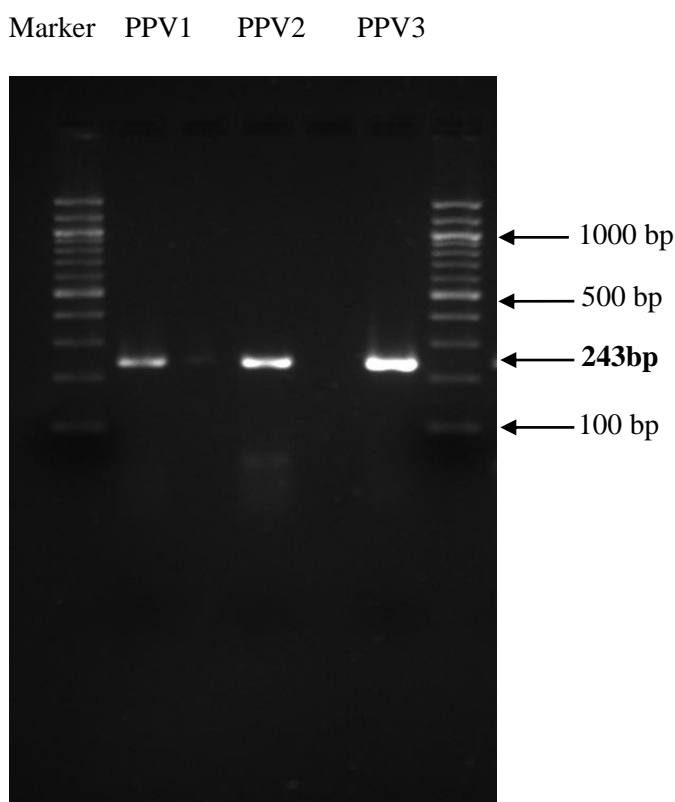
5 VÝSLEDKY

Dílčí cíl bakalářské práce spočíval v ověření vhodnosti vybraného metodického postupu pro detekci viru šarky v mšici.

Z odebraných mšic uchovaných v RNALateru se pomocí činidla TRI Reagent s úspěchem podařilo vyizolovat virovou RNA. Tato RNA byla použita jako templát k reverzní transkripci pro vlastní syntézu cDNA.

K amplifikaci cDNA prostřednictvím PCR byly využity dva specifické primery P1 a P2, určené přímo k detekci viru šarky. Délka ampliconů, získaných použitím těchto primerů je 243 bp. Výsledné produkty PCR byly při agarózové elektroforéze srovnávány s velikostním standardem 100 bp DNA Ladder (obr. 6).

Ze získaných kladných výsledků a uvedeného obrázku 6 je také patrné, že zvolená metodika je pro detekci viru v hmyzím vektoru vhodná.



Obr. 6: Výsledek PCR reakce se specifickými primery P1 a P2 pro PPV.

6 DISKUZE

Pokus byl prováděn na vzorcích mšice švestkové (*Hyalopterus pruni*) z infikovaných stromů slivoně švestky (*Prunus domestica*) s prokazatelnými příznaky virové choroby šarky peckovin. Přírozeným hostitelem mšice švestkové jsou ovocné stromy z rodu *Prunus* a trst' rákosovitá (Askar a El-Hussieni, 2015).

Jarošová et al. (2009) doporučuje ke konzervaci vzorků mšic ethanol. Použití této látky je však vyhovující pouze v případě, je-li mezi odběrem mšic a samotnou izolací delší časová prodleva. Nevýhoda tohoto způsobu spočívá ve ztrátě zbarvení povrchu těla mšice. Tím je znesnadněno zařazení jedinců do konkrétního druhu. Z tohoto důvodu byl pro uchování vzorků mšic použit stabilizační roztok RNALater Solution. Toto reakční činidlo je vhodné jak pro zachování původního zbarvení mšic a jejich stabilizaci, tak pro ochranu buněčné RNA. RNALater minimalizuje nutnost okamžitého zpracování vzorků či mrazení vzorků v kapalném dusíku pro pozdější použití. Mšice tedy mohou být uloženy při teplotě - 20 °C až - 80 °C aniž by byla ohrožena kvalita nebo množství RNA pro následnou izolaci.

RNA byla izolována vysoce účinnou metodou za pomoci reakčního činidla TRI Reagent (TRIzol) vyvinutého Chomczynskim (1993). TRIzol je směsí guanidin thiokyanatanu a fenolu v mono-fázovém roztoku a je vhodný pro rychlou simultánní izolaci jak RNA, tak DNA a proteinů, které je možné extrahovat i z velmi malého množství tkání. Kladné výsledky použití této látky zaznamenal také Saponari et al. (2008) při detekci viru CTV (*Citrus tristeza virus*) v mšici bavlníkové (*Aphis gossypii*). Podobně úspěšná byla i detekce Y-viru bramboru (PVY) z mšice broskvoňové (*Myzus persicae*), mšice bavlníkové (*Aphis gossypii*) a kyjatky zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*), kterou provedli Kim et al. (2016).

Metodou RT-PCR a následnou vizualizací výsledných produktů na agarózovém gelu byla ověřována přítomnost viru ve vektoru. Pro tento postup byly využity specifické primery P1 a P2, navržené Wetzlem et al. (1991), určené přímo k identifikaci viru šarky. Použitím těchto primerů byly získány amplikony o velikosti 243 bp. Zmíněné primery slouží jako univerzální pro detekci všech kmenů viru šarky. Doporučuje je i evropská organizace pro ochranu rostlin EPPO ve svých publikacích pro diagnostiku PPV (Plum pox virus) (Normes OEPP EPPO Standards, 2004). Pozitivní výsledky využití primerů P1 a P2 zaznamenali také Olmos et al. (1997), kteří identifikovali PPV v mšici bavlníkové (*Aphis gossypii*) za pomoci heminested PCR (H-PCR), print-capture PCR (PC-PCR) a také prostřednictvím

kombinace těchto dvou metod, tedy heminested-print-capture-PCR (H-PC-PCR). Olmos et al. (2005) využili tyto primery také pro nested RT-PCR a real-time RT-PCR, a tak opětovně potvrdili výskyt viru šarky v mšici, tentokrát však v mšici broskvoňové (*Myzus persicae*).

Primery P1 a P2 bývají častěji využívány při detekci rostlinných virů z rostlinného materiálu, než k detekci virů z hmyzích vektorů. Manachini et al. (2004) prováděli transmisní testy viru šarky pomocí mšice hnízdotvorné (*Brachycaudus schwartzi*) a mšice chmelové (*Phorodon humuli*). Cíl pokusu spočíval v ověření, zda jsou mšice schopny přenést virus šarky z listů broskvoňe obecné (*Prunus persica*) infikovaných kmenem PPV-M na listy zdravé. Prostřednictvím metody RT-PCR potvrdili přítomnost viru šarky v inokulovaných listech. Z provedeného pokusu je zřejmé, že pokud mšice byla schopná virus přenést, musel v ní být patogen nutně přítomen. Kdyby tedy autoři otestovali jimi použité mšice na přítomnost viru šarky, například pomocí RT-PCR, pravděpodobně by dosáhli stejného výsledku, jaký přinesla i námi použitá metodika. Capote et al. (2010) prováděli podobný výzkum také na přenos kmene PPV-M. Pro metodu RT-PCR využili primery P1 a P2 jako univerzální, tedy pro potvrzení pouhé přítomnosti viru šarky a na základě těchto kladných výsledků si pro identifikaci konkrétního kmene navrhli vlastní primery.

7 ZÁVĚR

V první části práce byla zpracována literární rešerše shrnující obecné poznatky o mšicích jako vektorech s důrazem na způsoby přenosů rostlinných virů.

Pro praktickou část práce byl zvolen metodický postup detekce rostlinného viru v těle hmyzu, konkrétně mšice švestkové (*Hyalopterus pruni*). Vzorky mšic byly odebrány ze stromu slivoně švestky (*Prunus domestica*) s viditelnými příznaky napadení virem šarky švestky.

Virová RNA byla izolována pomocí metody využívající reakční činidlo TRI Reagent. Získaná RNA byla použita jako templátové vlákno pro RT-PCR. Přítomnost viru šarky v mšici švestkové byla prokázána na základě využití specifických primerů pro detekci viru šarky. Odpovídající velikost ampliconů byla potvrzena vizualizací PCR produktů na agarózovém gelu.

Pozitivní výsledek potvrzuje vhodnost užití metodiky pro detekci rostlinných virů v těle mšice.

Tato metodika může být uplatněna například při identifikaci konkrétního kmene viru šarky nebo při monitorování výskytu viruliferních mšic u ovocných stromů či ostatních zemědělských komodit. I když chemická ochrana proti mšicím infikovaných PPV není efektivní, u ostatních polních plodin by včasná signalizace mohla pomoci ke zlepšení ochranných opatření proti šíření přenašečů rostlinných virů.

8 SEZNAM LITERATURY

Askar S. I., El-Hussieni M. M. (2015). Biological aspects of the aphid parasitoid *Aphelinus albipodus* (Hayat & Fatima) (*Hymenoptera: Aphelinidae*) parasiting mealy plum aphid *Hyalopterus pruni* (Geoffroy) (*Homoptera, Aphidoidea*). *International Medical Journal*, 25: 619 - 623.

Albittar L., Ismail M., Bragard C., Hance T. (2016). Host plants and aphid hosts influence the selection behaviour of three aphid parasitoids (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*). *European Journal of Entomology*, 113: 516 – 522.

Blanc S., Michalakis Y. (2016). Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Current Opinion in Insect Science*, 16: 36 – 43.

Brault V., Uzest M., Monsion B., Jacquot E., Blanc S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 524 – 538.

Capote N., Cambra M. A., Botella P., Gorrís 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.

Carmo-Sousa M., Moreno A., Garzo E., Fereres A. (2014). A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, 186: 38 – 46.

Day E. R., Spring A. (2002). *Entomology fact sheet: Aphids*. Blacksburg: Virginia polytechnic institute and state university, s. 1 – 2.

Dedryver Ch. A., Ralec A. L., Fabre F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 539 – 553.

Dietzgen R. G., Mann K. S., Johnson K. N. (2016). Plant virus – insect vector interactions: Current and potential future research direction. *Viruses*, 8: 1 – 21.

Fereres A. (2000). Barrier crops as a cultural control measure of non-persistently transmitted aphid-borne viruses. *Virus Research*, 71: 221 – 231.

Fereres A., Moreno A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, 141: 158 – 168.

Flint M. L. (2013). *Pest Notes: Aphids*. Oakland: University of California, Agriculture and Natural Resource. Publ. 7404, s. 7.

Fryč D. (2015). *Mšice na bramborách*. Opava: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, s. 44.

Fryč D., Rychlý S. (2015). *Mšice: malý atlas do ruky*, 2. díl. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, s. 36.

Gillott C. (2005). *Entomology*. 3. ed. Dordrecht: Springer, s. 216 – 217.

Gray S., Cilia M., Granim M. (2014). Circulative, “Nonpropagative” virus transmission: An orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Advances in Virus Research*. 89: 141 – 185.

Gutiérrez S., Michalakis Y., Munster Van M., Blanc S. (2013). Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses. *Functional Ecology*, 27: 610 - 622

Hogenhout S. A., Redinbaugh M. G., Ammar El-Desouky (2003). Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. *Trends in Microbiology*, 11: 264 – 271.

Hoover G. A. (2004). *Entomology Notes: Aphids on ornamentals*. Pennsylvania: Pennsylvania state univerzity, s. 2.

Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15: 532 - 535.

Ingwell L. L., Eigenbrode S. D., Bosque-Pérez N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, 2: 6.

Jarošová J., Jaňourová B., Kumar J. (2009). *Metodika molekulární detekce žluté zakrslosti ječmene v jeho vektorech pomocí RT-PCR*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., s. 26.

Katis N. L., Tsitsipis J. A., Stevens M., Powell G. (2007). Transmission of plant viruses. In: Van Emden H. F., Harrington R. (eds). *Aphids as crop pests*. Cambridge: CAB International, s. 353 – 390.

Kim J., Cha D. J., Kwon M., Maharjan R. (2016). Potato virus Y (PVY) detection in a single aphid by one-step RT-PCR with boiling technique. *Entomological Research*, 46: 278 - 285.

Klass C. (2012). *Aphids*. Ithaca: College of agriculture and life sciences, Cornell University, Department of Entomology, s. 2.

Liu B., Preisser E. L., Chu D., Pan H., Xie W., Wang S., Wu Q., Zhou X., Zhang Y. (2013). Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and *Tomato Yellow Leaf Curl virus*. *Journal of Virology*, 87: 4929 – 4937.

Liu S., Bonning B. C., Miller W. A. (2006). A simple wax-embedding method for isolation of aphid hemolymph for detection of luteoviruses in the hemocoel. *Journal of Virological Methods*, 132: 174 – 180.

Manachini B., Casati P., Aliverti L., Cinanni L. (2004). Transmission of PPV-M to *Prunus persica* by *Brachycaudus schwartzi* and *Phorodon hunuli* (Hem., Aphididae). *Journal of Applied Entomology*, 128: 677 - 680.

Martín B., Collar J. L., Tjallingii W. F., Fereres A. (1997). Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *Journal of General Virology*, 78: 2701 – 2705.

Mauck K. E., Moraes C. M. D., Mescher M. C. (2014). Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell & Environment*, 37: 1427 – 1439.

Nault L. R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 521–541.

Ng J. C. K., Perry K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 5: 505 – 511.

Ng. J. C. K., Zhou J. S. (2015). Insect vector–plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges. *Current Opinion in Virology*, 15: 48 – 55.

Normes OEPP EPPO Standards: Diagnostic protocols for regulated pests (2004). *EPPO Bulletin*, 34: 115 - 157.

Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. (2005). Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151 - 155.

Olmos A., Cambra M., 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.

Ogawa K., Miuru T. (2014). Aphid polyphenisms: trans-generational developmental regulation through viviparity. *Frontiers in Physiology*, 5: 2 – 20.

Palacios I., Drucker M., Blanc S., Leite S., Moreno A., Fereres A. (2002). *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83: 3163 – 3171.

Pérez N. A. B., Eigenbrode S. D. (2011). The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Research*, 159: 201 – 205.

Racah B., Fereres A. (2009). Plant virus transmission by insects. *Encyclopedia of Life Sciences*, s. 9.

Reinbold C., Herrbach E., Brault V. (2003). Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology*, 84: 3473 – 3484.

Saponari M., Manjunath K., Yokomi R. K. (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 147: 43 - 53.

Sicard A., Zeddani J-L., Yvon M., Michalakakis Y., Gutiérrez S., Blanc S. (2016). Circulative nonpropagative aphid transmission of nanoviruses: an oversimplified view. *Journal of Virology*, 89: 9719 – 9726.

Stafford C. A., Walker G. P., Ullman D. E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 9350 – 9355.

Stafford C. A., Walker G. P., Ullman D. E. (2012). Hitching a ride: Vector feeding and virus transmission. *Communicative & Integrative Biology*, 5: 43 – 49.

Sutherland C. A. (2006). *Aphids & Their Relatives*. New Mexico: New Mexico State University, s. 6.

Šefrová H. (2006). *Rostlinolékařská entomologie*. Brno: Konvoj, s. 256.

Uzest M., Gardani D., Dombrovsky A., Cazevieille Ch., Cot D., Blanc S. (2010). The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure & Development*, 39: 221 – 229.

Warren P. L., Schalau J. (2014). *Aphids*. Tuscon: College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona. Publ. AZ1635, s. 3.

Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355 – 365.

Whitfield A. E., Rotenberg D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479 – 480: 278 – 289.