

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Gabriela Vrbová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Multigenová charakterizace izolátů *Turnip
mosaic virus* v České republice**

Bakalářská práce

Gabriela Vrbová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Gabriela VRBOVÁ**
Osobní číslo: **R18665**
Adresa: **Fráni Šrámka 1966, Frýdek-Místek – Místek, 73801 Frýdek-Místek 1, Česká republika**
Téma práce: **Multigenová charakterizace izolátů Turnip mosaic virus v České republice**
Téma práce anglicky: **Multigenic characterization of Turnip mosaic virus isolates from the Czech republic**
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

Shrnutí poznatků o genetické variabilitě viru mozaiky vodnice (Turnip mosaic virus, TuMV) a jeho výskytu v České republice.
Izolace RNA z rostlinného materiálu, detekce a PCR amplifikace genomických fragmentů TuMV a jejich sekvenování.
Fylogenetická analýza českých izolátů v kontextu celosvětového výskytu TuMV.

Seznam doporučené literatury:

Jenner C.E., Walsh J.A. (1996): Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology* 45: 848-856.
Li X., Zhu T., Yin X., Zhang C., Chen J., Tian Y., Liu J. (2017): The genetic structure of Turnip mosaic virus population reveals the rapid expansion of a new emergent lineage in China, *Virology Journal* 14:165; DOI 10.1186/s12985-017-0832-3.
Zheng G.H., Peng D.W., Tong Q.X., Zheng Z.Z., Ming Y.L. (2017): Occurrence of Turnip mosaic virus in *Phalaenopsis* sp. in China, *Journal of Plant Pathology*, 99 (3): 703-706.
Zhao L., Feng C., Hao X., Wang R., Hu L., Wang Q., Wu Y. (2014): Detection and molecular variability of Turnip mosaic virus (TuMV) in Shaanxi, China, *Journal of Phytopathology* 162: 519-522.
Zhu F., Sun Y., Wang Y., Pan H., Wang F., Zhang X., Zhang Y., Liu J. (2016): Molecular characterization of the complete genome of three basal-BR Isolates of Turnip mosaic virus infecting *Raphanus sativus* in China, *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 888; doi:10.3390/ijms17060888.

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Gabriela Vrbová
Název práce	Multigenová charakterizace izolátů <i>Turnip mosaic virus</i> v České republice
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.
Rok obhajoby práce	2022
Klíčová slova	<i>Turnip mosaic virus</i> , genetická informace, české izoláty
Počet stran	38
Počet příloh	0
Jazyk	čeština

SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá poznatky o *Turnip mosaic virus* (TuMV), ekonomicky významném viru brukvovitých (*Brassicaceae*).

Teoretická část práce se soustředí na *Turnip mosaic virus*. TuMV je charakterizován z molekulárního a genetického hlediska. Dále jsou popsány jeho biologické vlastnosti, kde je zmíněn jeho hostitelský okruh a přenos. Popsána je jeho genetická variabilita včetně rozdělení TuMV do jednotlivých fylogenetických skupin, geny rezistence u rostlin proti TuMV a kontrola a management TuMV.

V experimentální části byla provedena izolace RNA z rostlinného materiálu, PCR amplifikace, sekvenování a fylogenetická analýza. Byla zjištěna genetická variabilita dvou českých izolátů TuMV, TuMV29 a GZ42, které byly srovnány s izoláty z různých zemí. Bylo zjištěno, že oba izoláty patří do fylogenetické skupiny World-B. Nejpodobnější izolátu TuMV29 byly izoláty HC-9 a POL1 a izolátu GZ-42 byl nejpodobnější izolát CAR37.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Gabriela Vrbová
Title	Multigenic characterization of <i>Turnip mosaic virus</i> isolates from the Czech republic
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.
The year of presentation	2022
Keywords	<i>Turnip mosaic virus</i> , genetic information, czech isolates
Number of pages	38
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

This bachelor thesis deals with the knowledge of *Turnip mosaic virus* (TuMV), which is one of the economically most important viruses infecting *Brassicaceae*.

The theoretical part is focused on *Turnip mosaic virus*. TuMV is characterized from both molecular and genetic side. There is also description of its biology including host range, transmission, genetic variability with TuMV division into phylogenetic groups, genes of resistance in plants and control and management of TuMV.

In the experimental part there is described isolation of RNA from plant material, PCR amplification, sequencing and phylogenetic analysis. The genetic variability of two Czech isolates, TuMV29 and GZ42, has been found and sequences were compared with isolates from different countries. It was discovered that both isolates are part of the World-B phylogenetic group. Isolate TuMV29 showed highest identity with isolates HC-9 and POL1. Isolate GZ42 showed highest identity with polish isolate CAR37.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

podpis:

Děkuji prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení, pomoc a věnovaný čas při vypracování této bakalářské práce. A také děkuji za pomoc v experimentální části paní laborantce Janě Veselské.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	<i>Turnip mosaic virus</i>	3
3.1.1	Potyviry	3
3.2	Molekulární a genetická charakterizace TuMV	4
3.2.1	Virové proteiny	5
3.3	Biologické vlastnosti TuMV	7
3.3.1	Hostitelský okruh	7
3.3.2	Příznaky vyvolané virem	8
3.3.3	Způsob přenosu TuMV	10
3.3.4	Ovlivnění výnosu po infekci	10
3.4	Geografické rozšíření TuMV	11
3.4.1	Současné rozšíření TuMV	12
3.5	Genetická variabilita	13
3.5.1	Rozdělení TuMV do patotypů	13
3.5.2	Rozdělení TuMV do fylogenetických skupin	14
3.7	Geny rezistence proti TuMV u <i>Brassicaceae</i>	15
3.8	Kontrola a management TuMV	16
4	MATERIÁL A METODY	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	18
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	19
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	19
4.4.1	Izolace RNA z rostlinného materiálu	19
4.4.2	Reverzní transkripce	20
4.4.3	PCR reakce	20
4.4.4	Izolace PCR produktu z gelu	21
5	Výsledky	23
6	Diskuse	31
7	Závěr	34
8	Literatura	35

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

cDNA	komplementární DNA
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
PIPO	<i>Pretty interesting potyviriidae ORF</i>
rpm	otáčky za minutu, <i>revolutions per minute</i>
RNA	ribonukleová kyselina
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i> , virus mozaiky vodnice

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Schéma genomu TuMV.

Obrázek č. 2: Geografické rozšíření TuMV podle CABI

(<https://www.cabi.org/isc/datasheet/54306#todistributionDatabaseTable>). Červené jsou oblasti s prokázaným výskytem TuMV. Bílé jsou oblasti, kde výskyt TuMV nebyl publikován.

Obrázek č. 3: Nukleotidový fylogenetický strom izolátů TuMV vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Mega 7.0. Jako outgroup byl použit izolát ORM (AB701692.1). Jsou zaznačeny bootstrap hodnoty vyšší než 70. Měřítko představuje 0,050 substitucí na pozici. Po pravé straně jsou izoláty rozděleny do fylogenetických skupin. Zkoumané izoláty jsou zvýrazněny tučně.

Obrázek č. 4: Aminokyselinový fylogenetický strom izolátů TuMV vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Mega 7.0. Jako outgroup byl použit izolát ORM (AB701692.1). Jsou zaznačeny bootstrap hodnoty vyšší než 70. Měřítko představuje 0,020 substitucí na pozici. Po pravé straně jsou izoláty rozděleny do fylogenetických skupin. Zkoumané izoláty jsou zvýrazněny tučně.

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Rozmístění rekombinačních míst. V prvním řádku jsou proteiny kódované nukleotidovou sekvencí viru. V druhém řádku počet rekombinačních míst.

Tabulka č. 2: Seznam analyzovaných vzorků.

Tabulka č. 3: Použité primery

Tabulka č. 4: Teplotní a časový průběh PCR.

Tabulka č. 5: Charakteristika čtecích rámců ORF1 a ORF2 (PIPO) a jednotlivých proteinů izolátů TuMV29 a GZ42.

Tabulka č. 6: Analýza identity sekvencí pokrývajících kódující oblast izolátů TuMV v procentech [%]. Pomocí barevné škály je zaznačena míra identity mezi sekvencí. Čím světlejší je značení pole, tím je identita mezi sekvencemi nižší. Studované izoláty TuMV29 a GZ42 jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka č. 7: Analýza identity aminokyselinových sekvencí izolátů TuMV v procentech [%]. Pomocí barevné škály je zaznačena míra identity mezi sekvencí. Čím světlejší je značení pole, tím je identita mezi sekvencemi nižší. Studované izoláty TuMV29 a GZ42 jsou zvýrazněny tučně.

Tabulka č. 8: Referenční izoláty TuMV použité k fylogenetické analýze.

1 ÚVOD

Mezi nejvýznamnější viry infikující polní plodiny patří *Turnip mosaic virus*, která je řazen do čeledi *Potyviridae*. Tento virus je celosvětově rozšířený, a to hlavně lidskou činností. Má široký okruh hostitelů. Napadá až 43 čeledí rostlin, hlavně brukvovité (*Brassicaceae*). Po světě se *Turnip mosaic virus* vyskytuje v několika dobře rozlišitelných kmenech. Virus je přenášen mšicemi a v menší míře také semeny. Jedná se o neobalený virus složený z nukleové kyseliny a proteinového pláště. Genom představuje jedno vláknová RNA nesoucí 2 čtecí rámce kódující dohromady 11 proteinů. ORF1 kóduje 10 proteinů a ORF2 (PIPO) kóduje protein P3N-PIPO.

Znalosti o genomu TuMV a jeho rozdílech mezi jednotlivými izoláty mají široké využití. Používají se ke šlechtění a genetickým modifikacím hybridních rostlin, které tak získávají rezistenci vůči viru a tím se dokáže zmenšit hospodářský dopad u plodin.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí poznatků o *Turnip mosaic viru* (TuMV) v rámci jeho genetické variability a výskytu, izolace RNA z rostlinného materiálu, detekce RNA, PCR amplifikace genomických fragmentů TuMV a sekvenování těchto fragmentů, včetně provedení fylogenetické analýzy českých izolátů a jejich srovnání s celosvětovou populací TuMV.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Turnip mosaic virus*

Turnip mosaic virus (TuMV, virus mozaiky vodnice) patří mezi nejrozšířenější viry rostlin a vyskytuje se po celém světě. Poprvé byl popsán roku 1921 ve Spojených státech amerických na brukvi *Brassica campestris* (Morero a Fereres, 2012), ale již roku 1862 byly ve Francii pozorovány symptomy odpovídající TuMV na fiale šedivé (*Matthiola incana*). TuMV je jediný rostlinný virus, který byl zaznamenán na Islandu (Kegler et al., 1998). Byl hodnocen jako druhý nejdůležitější virus infikující polní plodiny. Za významnější je považován pouze *Cucumber mosaic virus*. TuMV je ekonomicky významný kvůli rozsáhlým škodám na zemědělských plodinách, například na brukvi řepce olejce (*Brassica napus* subsp. *napus*). Způsobuje škody i na zelenině, například na tuřínu (*Brassica napus* subsp. *napobrassica*) nebo čínském zelí (*Brassica rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*), ale i na okrasných rostlinách (Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021; Walsh a Jenner, 2002).

Turnip mosaic virus se řadí mezi potyviry a má široký okruh hostitelů čítající 318 druhů rostlin patřících do 43 různých čeledí. Infikuje především brukvovité rostliny. Pro jeho izolaci a k jeho udržování ve skleníkových podmínkách se nejčastěji používá petúnie (*Petunia* sp.), tabák (*Nicotiana glutinosa*), brukev pekingská (*Brassica pekinensis*) a brukev řepák (*B. rapa*) (Morero a Fereres, 2012; Nguyen et al., 2013, Zhu et al., 2016).

TuMV je velice variabilní a bylo popsáno více než 100 různých izolátů tohoto viru. Studium variability TuMV na genetické a molekulární úrovni rozšířilo poznatky o jeho biologii, virulenci a adaptaci na hostitele (Nguyen et al., 2013; Zhu et al., 2016).

3.1.1 Potyviry

Potyviry jsou nejrozsáhlejší rod největší čeledi rostlinných virů *Potyviridae*. Potyviry jsou vláknité viry dlouhé 700–750 nm. Každý virion obsahuje jednu kopii genomu ve formě jednovláknového řetězce RNA o velikosti přibližně 10 000 nukleotidů. Jejich genom má jeden velký čtecí rámeček a jeden malý čtecí rámeček označovaný PIPO. Translací je genetická informace přepisována do polyproteinu, který je dále hydrolyzován na několik menších proteinů (Ohshima et al., 2002).

Potyviry jsou rozšířeny nejvíce v subtropickém a mírném pásu světa. S největší pravděpodobností vznikly v západní Eurasii nebo v Severní Americe. Mnoho je jich přenášeno mšicemi. Infikují široký okruh hostitelů v rámci jednoděložných i dvouděložných rostlin. (Nguen et al., 2013; Zhu et al., 2016).

Mezi Potyviry se mimo jiné řadí také *Lettuce mosaic virus* (virus mozaiky salátu), *Plum pox virus* (virus šarky švestky), *Potato virus Y* (Y virus bramboru), *Papaya ringspot virus* a *Zucchini yellow mosaic virus* (virus žluté mozaiky cukety).

TuMV patří do skupiny virů podobných *potato virus Y*. K podobným virům patří také *Japanese yam virus*, *Narcissus late season yellows virus*, *Narciss yellow stripe virus*, *Scallion mosaic virus* a *Wild onion symptomless virus*. Tyto viry byly většinou izolovány z jednoděložných rostlin, například z divokých orchidejí (Kawakubo et al., 2020; Nellist et al., 2021).

3.2 Molekulární a genetická charakterizace TuMV

TuMV je vláknitý virus. Viriony jsou dlouhé 700 až 750 nm a na šířku mívají přibližně 13 až 15 nm. Viriony jsou flexibilní a každý virion obsahuje pouze jednu kopii virového genomu. Genom tvoří jedno vláknový řetězec (+)RNA, který je tvořen přibližně 9 835 nukleotidy. RNA molekula obsahuje jeden velký čtecí rámec (ORF1) a jeden malý čtecí rámec ORF2 (PIPO). Genetická informace je překládána do jedné molekuly polyproteinu. Polyprotein je následně hydrolyzován na 10 funkčních proteinů. RNA molekulu obalují podjednotky plášťového proteinu. Tyto podjednotky jsou v levotočivém helikálním uspořádání. Virion je tvořen z cca 95 % plášťovým proteinem a z 4–5 % RNA. Virová RNA obsahuje 31,7 % adeninu, 22,0 % guaninu, 27,2 % cysteinu a 19,1 % uracilu (Choi et al., 1979). Molekulární hmotnost RNA byla pomocí sedimentační analýzy a elektroforézy stanovena na 35 kD. Gen plášťového proteinu se skládá z 288 aminokyselin a má molekulární hmotnost 33,2 kD. Jeden virion obsahuje přibližně 2 000 podjednotek plášťového proteinu. Tyto podjednotky interagují s RNA molekulou pomocí N-koncového raménka (*N-terminal arm*). N-koncové raménko také spojuje jednotlivé podjednotky plášťového proteinu. V rámci genomu vytváří podjednotky plášťového proteinu alfa-helikální jádro s dvěma dlouhými raménky (Cuesta et al., 2019; Nguyen et al., 2013; Revers a Garcia, 2015; Shattuck, 1992).

5' konec genomu je zakončen čepičkou na kterou je kovalentně navázán virem kódovaný VPg protein. 3' konec genomu je zakončen poly-A koncem, který může mít variabilní délku. Tento genom má jeden velký čtecí rámec (ORF1). Čtecí rámec ORF1 je vložen mezi dvěma nepřekládanými regiony (UTR). Genom má také jeden menší čtecí rámec označovaný ORF2

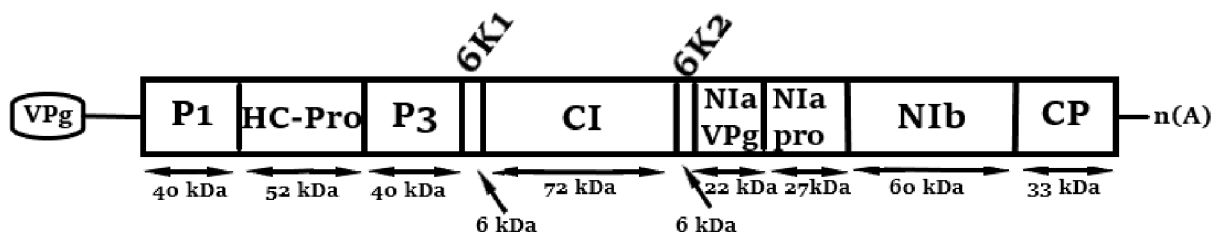
(PIPO). Po translaci ORF1 se vzniklý polyprotein upravuje třemi virem kódovanými proteázami (Walsh a Jenner, 2002).

Plášťový protein viru byl mimo jiné zkoumán i pomocí kryoelektronové mikroskopie (cryoEM). Touto metodou bylo zjištěno, že struktury plášťových proteinů s helikální symetrií u různých rostlinných virů jsou téměř strukturně totožné i když nesdílí stejné nukleotidové sekvence. Například *Turnip mosaic virus* má téměř stejnou strukturu plášťového proteinu jako *Bamboo mosaic virus* nebo *Watermelon mosaic virus*.

TuMV tvoří v hostitelské buňce tzv. cylindrické inkluze, což jsou agregáty nestrukturních proteinů. Jsou kódovány genomem viru a po obarvení jsou viditelné pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Inkluze se objevují v epidermálních a floémových buňkách. Mohou se objevovat jak u systémově infikovaných rostlin, tak i u rostlin vykazujících pouze lokální symptomy. Velikost inkluzí může být různá a závisí na velikosti hostitelské rostliny. Z hostitelských buněk mohou úplně vymizet po uplynutí určitého času (Shattuck, 1992).

3.2.1 Virové proteiny

Jak již bylo řečeno, virová RNA, přesněji čtecí rámec ORF1, je překládána do jednoho polyproteinu, který je dále upravován do 10 proteinů. Tyto proteiny jsou P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIa pro, NIb a CP. Schématické zobrazení jednotlivých proteinů v jejich pořadí a s jejich molekulovou hmotností je zobrazena na obrázku č. 1. Podrobnější informace o každém proteinu jsou vypsány níže.



Obrázek č. 1: Schéma genomu TuMV.

Protein P1

P1 protein je velice jednoduchý, ale velmi variabilní. Jeho molekulová hmotnost je 40 kDa. P1 dokáže vázat jednořetězcové nukleové kyseliny, a to RNA i DNA. Funguje jako proteáza a pomocí štěpného místa dokáže štípat C konec nově vznikajícího polyproteinu (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Protein HC-Pro (*helper component protease*)

HC-Pro navazuje v genomu po P1 a jeho relativní molekulová hmotnost je 52 kDa. HC-Pro má mnoho funkcí, hlavně při přenosu viru mšicemi. Při přenosu napomáhá navázání virového pláště ke styletům hmyzu. HC-Pro má také proteázovou aktivitu a usnadňuje viru průchod plasmodesmaty buněk při pohybu viru mezi buňkami hostitele (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Protein P3

P3 je společně s P1 nejvariabilnějším proteinem TuMV. Jeho relativní molekulová hmotnost je 40 kDa. Jeho funkce je zatím neznámá, ale mohl by se podílet na tvorbě symptomů u hostitelské rostliny (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Protein 6K1

Jedná se o velmi krátký protein, který by mohl být propojený s P3 proteinem, ale to zatím nebylo potvrzeno. Jeho relativní molekulová hmotnost je 6 kDa. Jeho funkce není známa, ale je možné že dokáže regulovat aktivitu P3 proteinu (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Protein CI (*cytoplazmatická / cylindrická inkluze*)

CI protein je pojmenován podle inkluzí, které vytváří v cytoplazmě. Jeho relativní molekulová hmotnost je 72 kDa, což ho činí největším proteinem viru. Tvoří cylindrické inkluze, které mohou být morfologicky různé a souvisí s variabilitou nukleotidové sekvence tohoto proteinu. Protein se nachází hlavně kolem plazmodesmat buňky a mohl by hrát roli v prostupu viru mezi buňkami. Zatímco jeho C konec je variabilní, jeho N konec je konzervovanější a obsahuje 2 epitopy (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Protein 6K2

Protein 6K2 je stejně jako protein 6K1 velmi malý a jeho relativní molekulová hmotnost činí 6 kDa. Protein bývá spojen s membránou buňky (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

VPg protein (*virus-encoded genom linked protein*)

VPg protein má molekulovou hmotnost 22 kDa. Je součástí replikačního komplexu. Zapojen je i do translace a má vliv na polymerázovou aktivitu N1b. VPg je kovalentně navázaný na nukleotid na 5' konci (+) i (-) RNA řetězce a mohl by být zapojen do iniciace syntézy řetězců (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

NIa protein (*nuclear inclusion a*)

NIa protein má funkci proteázy. Obsahuje několik štěpných míst, které mají vliv na stabilitu a podílí se na kontrole proteolytické aktivity během životního cyklu viru. V pořadí třetí štěpné místo dokáže oddělit 36 aminokyselin z C konce a regulovat proteázovou aktivitu. Relativní molekulová hmotnost NIa proteinu je 22 kDa (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

NIb protein (*nuclear inclusion b*)

NIb má tři konzervované domény. Má funkci RNA dependentní RNA polymerázy a dokáže využít UTR na 3' konci řetězce k vytvoření komplementárního vlákna RNA. Molekulová hmotnost proteinu je 60 kDa (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

Plášťový protein CP (*coat protein*)

Plášťový protein má relativní molekulovou hmotnost 33 kDa. Jeho hlavní funkce je ochrana virové DNA. N-konec plášťového proteinu je velmi konzervovaný a je zapojený do navázání plášťového proteinu k pomocným komponentům a následně ke styletům mšic. Jeho další funkcí je zvýšení propustnosti plazmodesmat a tím přispívat k mezibuněčnému přenosu viru a k přenosu viru po těle hostitelské rostliny (Ohshima et al., 2007; Walsh a Jenner, 2002).

3.3 Biologické vlastnosti TuMV

3.3.1 Hostitelský okruh

Turnip mosaic virus je rozšířen po celém světě a má mnoho hostitelů patřících do celkem 43 čeledí. Nejčastěji infikuje virus rostliny patřící do čeledí brukvovitých (*Brassicaceae*), hvězdnicovitých (*Asteraceae*), merlíkovitých (*Chenopodiaceae*), bobovitých (*Leguminosae*) a hvozdíkovitých (*Caryophyllaceae*) (Walsh a Jenner, 2002). Běžným hostitelem jsou brukvovité plodiny, a to hlavně květák (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), brokolice (*B. oleracea* var. *italica*), zelí (*B. oleracea* convar. *capitata*), růžičková kapusta (*B. oleracea* convar. *oleracea* var. *gemmifera*), kedluben (*B. oleracea* var. *gongylodes*), křen (*Armoracia rusticana*) tuřín (*B. napus* subsp. *Napobrassica*) a čínské zelí (*B. rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*). Mimo čeleď *Brassicaceae* infikuje například hrách (*Pisum sativum*), řeřichu (*Lepidium* sp.), reveň (*Rheum* sp.), a salát (*Lactuca sativa*). Může infikovat i okrasné rostliny, například mračňák (*Abutilon* sp.) a fialu (*Matthiola* sp.). V neposlední řadě infikuje i trávovité rostliny (*Poales*) (Jenner a Walsh, 1996; Zhu et al., 2016).

3.3.2 Příznaky vyvolané virem

Nejčastější symptomy při infekci rostliny TuMV jsou chlorotické mozaiky na listech, chlorotické a nekrotické lokální léze, nekrotická kroužkovitost, prosvětlení žilek na listech, deformace listové čepele, zakrslost, opadnutí starších listů, redukce tvorby semen a uhynutí rostliny (Morero a Fereres, 2012; Nellist et al., 2021; Shattuck, 1992).

Symptomy se mohou různit a jejich intenzita závisí na mnoha faktorech. Jsou odlišné u různých izolátů TuMV, různých hostitelů a ovlivňuje je i prostředí. Liší se také stářím rostliny a ročním obdobím (Nguen et al., 2013). Symptomy může ovlivnit přítomnost jiného viru či patogenu a závažnost symptomů odráží koncentraci viru v hostitelských tkáních (Shattuck, 1992).

Symptomy TuMV se mohou na rostlině objevit lokálně, pouze na určitých místech, nebo mohou systémově zasáhnout celou rostlinu. Systémové symptomy jsou závažnější a objevují se většinou u mladých či naopak starých rostlin. Systémové nekrotické reakce u určitých druhů brukvovitých vedou k uhynutí rostliny.

Virová infekce se projevuje i na semenech brukvovitých rostlin (*Brassicaceae*). Semena mohou být prázdná nebo obsahovat léze. Semena jsou také menší než u zdravé rostliny. Mozaiky nejsou pro rostlinu smrtelné, ale oslabují rostlinu, což často vede k sekundárním infekcím jiných závažnějších patogenů (Morero a Fereres, 2012; Nellist et al., 2021; Shattuck, 1992).

U okrasných rostlin patří mezi symptomy také změna antokyanových pigmentů tvorby tkání okvětních lístků, což vede k tvorbě abnormálních sektorů, pruhů a skvrn. Tyto symptomy se projevují například u fialy šedivé (*Matthiola incana*) a chejru vonného (*Cheiranthus cheiri*) (Shattuck, 1992).

Symptomy u zelí (*B. oleracea* convar. *capitata*) a čínského zelí (*B. rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*)

U zelí a čínského zelí se objevuje systémové prosvětlení žilek na listech, chlorotická mozaiky, nekrotické léze, kroužkovitost. Listy mohou být zakrslé a zkroucené. Hlávky zelí mohou obsahovat vnější nebo vnitřní nekrotické léze a jejich hmotnost při sklizni bude nižší (Shattuck, 1992).

Symptomy u tuřínu (*B. napus* subsp. *napobrassica*)

U tuřínu bývají symptomy různorodé, ale často se objevují systémové symptomy ve formě mozaik, chlorotických a nekrotické kroužkovitosti. Jako první projevený symptom se objevuje

zahnutí špičky nových listů dolů a následně zpětné zakřivení listové čepele a celková deformace listů. S nekrózou listů je spojena také změna zbarvení kořene (Shattuck, 1992).

Infekce může vést i k uhynutí rostliny, to záleží na životní etapě, ve které se rostliny nachází při napadnutí virem a také na izolátu viru. Časté úmrtí jsou u rostlin v rané fázi vývoje, kdy se infekce projeví jako systémová mozaiková reakce, která vede k zastavení vývoje a k redukci kořenového systému (Shattuck, 1992).

Symptomy u salátu (*Lactuca sativa*) a některých dalších brukvovitých

Mezi příznaky infekce u salátu patří malá chlorotické mozaiky, kruhovitě i nepravidelné léze na listech, nekrózy a deformace listové čepele (Nellist et al., 2021).

U květáku (*B. oleracea* var. *botrytis*) a růžičkové kapusty (*B. oleracea* var. *gemmifera*) se objevuje kroužkovitost na listech a nekrotické skvrny. U brukve řepky olejky (*B. napus* subsp. *napus*) se objevují mozaiky, deformace listů a zakrslost (Nellist et al., 2021).

Dlouhodobá infekce u vytrvalých rostlin

V přírodě nemusí rostlina po napadení virem ihned uhynout. Virus může v rostlině velmi dlouho přežívat. U vytrvalé rostliny řeřišničníku Hallerově (*Arabidopsis halleri*) byla pozorována infekce TuMV na rostlině 3 roky. Po dobu těchto 3 let se neobjevily silné příznaky infekce (Honjo et al., 2020).

V přirozených ekosystémech rostliny dokáží s virem přežívat. Rostliny jsou schopné normálního růstu a reprodukce. Infekce rostliny nesmí být příliš silná, čehož je dosaženo malým množstvím viru přítomného v rostlině nebo nízkou virulencí viru, jehož akumulace je vysoká (Honjo et al., 2020).

Příklad dlouhodobé infekce rostlin v přirozeném ekosystému jsou populace řeřišničníku Hallerově (*A. halleri*) v centrálním Japonsku. Rostliny z této populace jsou nakaženy TuMV zcela běžně, ale na rostlinách se neprojevují téměř žádné příznaky. Dokáží se rozmnožovat vegetativně pomocí tvorby růžic, pomocí kterých se virus dokáže přenášet i na potomstvo. U těchto dlouhodobých infekcí bylo zjištěno, že viry jsou závislé na ročních obdobích, tedy na teplotě. Na teplotě velmi závisí schopnost viru se replikovat. Ideální teplota pro replikaci se pohybuje mezi 15°C a 30°C. U rostlin se objevuje mozaika hlavně na podzim, a pokud je teplota okolí nižší než 15°C, tedy hlavně přes zimu, virus se replikuje minimálně. Toto patří mezi mechanismy, které pomáhají rostlině udržovat akumulaci viru nízkou. Mezi tyto mechanismy mimo jiné patří také umlčování virové RNA (Honjo et al., 2020).

3.3.3 Způsob přenosu TuMV

Virus je přenášen 89 druhy polyfágních mšic. Mezi tyto přenašeče patří zejména mšice bavlníková (*Aphis gossypii*), mšice trýzelová (*Lipaphis erysimi*), mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*), mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) a mšice kukuřičná (*Rhopalosiphum maidis*). Na některých lokalitách je dominantním přenašečem pouze jeden druh mšice. V České republice přenáší TuMV hlavně mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) (eagri.cz). Mšice trýzelová (*Lipaphis erysimi*) je hlavní přenašeč viru v teplých částech Asie a v Ontariu TuMV přenáší hlavně mšice kukuřičná (*Rhopalosiphum maidis*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) (Adachi, 2018; eagri.cz; Nellist, 2021; Shattuck, 1992).

Mšice přenáší virus neperzistentním způsobem. Při neperzistentním způsobu přenosu zůstává virus pouze v bodavě sacím ústrojí mšic. Virus neproniká do celého těla mšice a ani se v ní nereplikuje. Doba nabývacího sání, po kterém mšice začne přenášet virus, je velmi krátká. Trvá pouze několik minut. Není přesně známo, jak dlouho dokáže mšice virus přenášet. Uvádí se, že mšice je infekční méně než 4 hodiny. Mšice přenesou virus, pokud saje z listu, který je napaden TuMV a hned vzápětí saje ze zdravého listu jiné rostliny (Adachi et al., 2018; Nellist et al., 2021).

TuMV dokážou pravděpodobně přenášet i dřepčící (*Phyllotreta* sp.) (Carden a Gladders, 1984) a některé druhy třásněnek jako například třásněnka úzkohlavá (*Thrips angusticeps*) (Tompkins, 1939).

Turnip mosaic virus může být také přenášen infikovanými semeny. Přenos semeny je závislý na typu izolátu a hostitelské rostlině. Při zkoumání tohoto přenosu bylo zjištěno, že konkrétní izolát TuMV se přenášel semeny brukve (*Brassica* sp.) ve frekvenci 40 %. U semen travin nebyl přenos potvrzen. U huseníčku (*Arabidopsis* sp.) byl zaznamenán přenos semeny, ale pouze v malé míře. Procentuální výsledky udávají, že přenos viru semeny u huseníčku (*Arabidopsis* sp.) kolísal přibližně od 0 % do 4 % (Nellist et al., 2021; Zhu et al., 2016).

3.3.4 Ovlivnění výnosu po infekci

TuMV je ekonomicky významný kvůli rozsáhlým škodám na zemědělských plodinách, například na brukvi řepce olejce (*Brassica napus* subsp. *napus*). Způsobuje škody i na zelenině, například na tuřínu (*Brassica napus* subsp. *napobrassica*) nebo čínském zelí (*Brassica rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*), ale i na okrasných rostlinách. U napadených rostlin snižuje výnos a jejich kvalitu. V Kanadě byly prokázány až 30% ztráty výnosů u tuřínu (*B. napus* subsp.

napobrassica). Ve Spojeném království byly zaznamenány 70% ztráty ve výnosu semen brukve řepky olejky (*Brassica napus* subsp. *napus*) a v Keři byly zaznamenány 50% ztráty ve výnosu hlávkového zelí (*B. oleracea* convar. *capitata*) (Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

3.4 Geografické rozšíření TuMV

Předchůdce TuMV infikoval dvouděložné rostliny a jeho schopnost infikovat brukvovité dvouděložné rostliny se vyvinula teprve nedávno.

TuMV se pravděpodobně vyvinul z příbuzného TuMV-OM infikujícího orchideje (*Orchidea*). Tato monofyletická sesterská varianta byla objevena teprve nedávno a bylo vyloučeno, že by se vyvinula z TuMV. TuMV-OM byl izolován z evropských orchidejí, je velice podobný TuMV, ale nenapadá brukvovité rostliny. Bylo zjištěno, že TuMV se oddělil od linie TuMV-OM před 1000 lety v Eurasii. Centrum vzniku TuMV bylo pravděpodobně na území Středozeří a na Blízkém východě. O dalších 150 let později se TuMV rozdělil na 4 fylogenetické skupiny (basal-B, world-B, basal-BR, Asian-BR), které existují do dnešní doby. Do celého světa se z Evropy TuMV rozšířil přibližně před 500 lety (Kawakubo et al., 2020; Nguyen et al., 2013).

Kmen Iranian se pravděpodobně vyvinul později než kmen basal-B a možná i později než další kmény. Nasvědčuje tomu nukleotidová sekvence jejich izolátů, která vykazuje nižší nukleotidovou diverzitu (Kawakubo et al., 2020).

Migrační cesty TuMV od místa jeho vzniku se podle vědců shodují s hlavními historickými obchodními cestami. K rozšíření hodně přispěla Hedvábná stezka, která byla do 18. století hlavním obchodním spojníkem Eurasie. Velkou zásluhu na rozšíření TuMV po světě má lidská činnost. Jako hlavní uzel pro migraci TuMV se stala severovýchodní Čína (Kawakubo et al., 2020).

Kmen Asian-BR

Kmen Asian-BR vznikl v Turecku nebo v Itálii. Pokud vznikl v Itálii, dostal se velice rychle do Turecka. Podle některých důkazů se z Turecka dostal do Íránu a z něj na jih Asie. Další migrační cesta tohoto kmenu vedla z Nepálu nebo z Japonska do severovýchodní Číny. Severovýchodní Čína posloužila jako místo, odkud se TuMV rozšířil do centrální Číny, jihovýchodní Číny, Indie, Japonska a možná také do Vietnamu. Do Indie se TuMV mohl dostat také z Íránu. Další rozšíření tohoto kmenu TuMV bylo způsobeno lidskou pomocí obchodních cest, kde se transportoval v rostlinném materiálu. Kmen se takto dostal do jižní a jihovýchodní Eurasie (Kawakubo et al., 2020).

Kmen basal-BR

Kmen basal-BR pravděpodobně vznikl v Itálii a následně se v rostlinném materiálu rozšířil do Japonska. Taktéž se dostal do Íránu a z něj do provincie Xinjiang v Severozápadní Číně. Následovalo jeho šíření do centrální Číny a dále Hedvábnou stezkou. Tento kmen způsobil epidemii TuMV v Číně, Japonsku a Jižní Koreji (Kawakubo et al., 2020).

Podskupina world-B3

Tato podskupina TuMV se cirkulačně šířila z Asie do Evropy a zpět. Touto migrací se rozdělila na 2 typy s rozdílnou patogenitou. Zatímco asijské izoláty infikují rostliny *Brassica* i *Raphanus*, evropské izoláty dokážou infikovat pouze rostliny *Brassica* a nikoliv *Raphanus*. Existují stopy migrace této podskupiny mezi Spojeným královstvím, Japonském, Českou republikou a Řeckem. Další možné migrační cesty vedou se severovýchodní Číny do jihovýchodní Číny a celého jihovýchodu Asie. Pro Asii byla hlavním zdrojem šíření severovýchodní Čína, pro Evropu to bylo Spojené království (Kawakubo et al., 2020).

U ostatních linií nejsou migrační cesty zatím objasněny.

3.4.1 Současné rozšíření TuMV

TuMV je rozšířen celosvětově na všech kontinentech s výjimkou Arktidy a Antarktidy. Jak lze vidět na mapě na obrázku č. 2, je virus rozšířen po celé Severní Americe, tedy USA i Kanady a taktéž i v částech Jižní Ameriky na území Venezuely, Brazílie (Costa, 2010) a Argentiny (Pontis, 1973). Dále se TuMV lokálně vyskytuje v Austrálii (Jenner a Walsh, 1996) a na několika místech Afriky. V Africe příliš rozšířený není, ale byl nalezen na území Keňi (Jenner a Walsh, 1996), Mauriciu (Gungoosingh, 2001), Maroka (Fischer a Lockhart, 1976) a Zimbabwe (Chivasa, 2002) a v Jižní Africe (McClellan a Cowin, 1953). V Evropě je jeho výskyt potvrzen v Belgii, Rakousku, České republice, Slovensku, Bulharsku, Chorvatsku, Dánsku, Francii, Německu, Řecku, Maďarsku, Itálii, Litvě, Nizozemsku, Polsku, Portugalsku, Rumunsku, Rusku, Španělsku, Švédsku a také ve Velké Británii (CABI; Jenner a Walsh, 1996; Moreno a Fereres, 2012), Rusku (Jenner a Walsh, 1996) a ve Švédsku (Shattuck, 1992). Nejvíce je TuMV rozšířen v Asii, a to na pevnině i některých ostrovních státech. Jeho výskyt je potvrzen v Číně, Indii, Izraeli, Íránu, Japonsku, Jemenu, Nepálu, Filipínách, Saudské Arábii, Singapuru, Jižní Koreji, Taiwanu, Thajsku, Turecku, Uzbekistánu, Vietnamu (CABI; Liu et al., 1996).



Obrázek č. 2: Rozšíření TuMV podle CABI

(<https://www.cabi.org/isc/datasheet/54306#todistributionDatabaseTable>). Červené jsou oblasti s prokázaným výskytem TuMV. Bílé jsou oblasti, kde výskyt TuMV nebyl publikován.

3.5 Genetická variabilita

Existuje několik systémů rozdělení TuMV založených na různých kritériích. Tyto systémy vznikaly postupně od roku 1980 a některé byly rozšiřovány. Již bylo popsáno více než 100 různých izolátů tohoto viru (Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

3.5.1 Rozdělení TuMV do patotypů

První rozdělení izolátů TuMV do patotypů uvedl roku 1980 R. Provvidenti. Zkoumal několik izolátů viru původem z čínského zelí (*B. rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*) a tyto izoláty rozlišil do 4 patotypů, C1-C4. Izoláty byly rozděleny podle symptomů a podle rezistence rostliny k danému izolátu. Později byl v Taiwanu k základnímu rozdělení přidán patotyp C5 (Green a Deng, 1985), následně v Kanadě další dva patotypy S5 a C6 (Stobbs a Shattuck, 1989). A nakonec byly v Číně na brukvovitých rostlinách identifikovány patotypy C7 a C8 (Liu et al., 1990).

TuMV rozdělil do patotypů také Liu a spolupracovníci roku 1990. Patotypy byly rozděleny podle typu symptomů a vážnosti infekce na tuřinu (*Brassica napus* var. *napobrassica*) a dalších brukvovitých. Izoláty byly rozděleny do 7 patotypů pojmenovaných Tu1 až Tu7 (Liu et al., 1990; Walsh a Jenner, 2002).

Systém podle C. E. Jennera a J. A. Walshe z roku 1996 rozděluje izoláty TuMV do patotypů podle patogenity a podle hostitelských rostlin, které jsou vůči nim rezistentní. Při tomto systému

se virová infekce zkoumala hlavně na rostlinách tuřinu, čínského zelí a případně i na dalších brukvovitých rostlinách. Pomocí těchto kritérií byl TuMV rozdělen do 12 rozdílných patotypů (Jenner a Walsh, 1996)

3.5.2 Rozdělení TuMV do fylogenetických skupin

Podle okruhu hostitelů byl virus rozdělen do 3 fylogenetických skupin. Izoláty, které napadají převážně Brukve (*Brassica*) spadají pod fylogenetickou skupinu s označením [B]. Napadení izolátem této linie je často letální. Tyto izoláty neinfikují ředkve (*Raphanus*) a způsobují mozaiky na listech. Izoláty fylogenetické skupiny [B(R)] infikují hlavně brukve (*Brassica*), ale dokáží infikovat i ředkve (*Raphanus*). U brukví (*Brassica*) tato skupina vyvolává pouze mozaiky listů, u ředkví (*Raphanus*) působí na rostlinu letálně. Poslední fylogenetická skupina má označení [BR] a její izoláty dokáží infikovat brukve (*Brassica*) i ředkve (*Raphanus*). Nepůsobí však letálně a u obou typů hostitelů vyvolává mozaiku listů. Někteří autoři uvádí pouze 2 hlavní fylogenetické linie a to [B] a [BR] (Nguen et al., 2013; Morero a Fereres, 2012).

Roku 2003 Sanchez rozděлил TuMV podle analýzy kódovací sekvence CP a biologických vztahů do 4 fylogenetických skupin. První skupina MB se vyskytuje hlavně u brukvovitých (*Brassica*). Druhá skupina MR se vyskytuje hlavně u ředkví (*Radish*). Třetí skupina tvoří přechod mezi těmito skupinami izolátů (IBR). Čtvrtá skupina je tvořena izoláty, které byly na jiných než na výše zmíněných rostlinách (OBR) (Sanchez et al., 2003).

Fylogenetické skupiny podle K. Tomimury a jejich další dělení

Poslední systém vytvořený roku 2003 K. Tomimurou rozděлил TuMV do 4 fylogenetických skupin na základě jejich sekvencí a geografického rozložení. Tyto skupiny se prolínají s rozdělením fylogenetických skupin na [B], [BR] a [B(R)], které jsou vypsány výše.

Nejvíce rozšířená a nejvíce variabilní je parafyletická skupina basal-*Brassica* (basal-B). Tato skupina je tvořena hlavně izoláty fylogenetické skupiny [(B)]. Izoláty z této skupiny napadají mnoho druhů brukví, ale dokáží infikovat i rostliny jiných čeledí. Tato skupina se objevuje hlavně v jihozápadní a centrální Eurasii. Basal-B má dvě podskupiny s to basal-B1 a basal-B2 (Tomimura et al., 2003; Nguyen et al., 2013; Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

Druhá skupina je pojmenována world-*Brassica* (world-B) a jak už její název vypovídá tato skupina je rozšířena po celém světě a v rámci hostitelů je velice variabilní. Má 3 podskupiny. World-B1 se vyskytuje hlavně v Brazílii, Kanadě a na Novém Zélandu. World-B2 se vyskytuje po celém světě, hlavně v Africe, Austrálii, Evropě a USA. World-B3 se vyskytuje hlavně

v Rusku a České republice (Tomimura et al., 2003; Nguyen et al., 2013; Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

Třetí skupinou je basal-*Brassica/Raphanus* (basal-BR). Tato skupina napadá jak *Brassica*, tak *Raphanus* rostliny. Vyskytuje se hlavně v Eurasii. Podle fylogenetické analýzy je blízká skupině basal-B (Tomimura et al., 2003; Nguyen et al., 2013; Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

Čtvrtou skupinou je Asian-*Brassica/Raphanus* (Asian-BR). Taktéž napadá jak *Brassica*, tak *Raphanus* rostliny. V rámci sekvencí je nejméně variabilní. Vyskytuje se ve východní Asii, a to hlavně v Japonsku (Tomimura et al., 2003; Nguyen et al., 2013; Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

K tomuto základnímu rozdělení byly později přidány ještě další 2 fylogenetické skupiny. První byla sesterská skupina napadající rostliny rodu *Orchidea*. Poslední přidaná fylogenetická skupina byla skupina *Iranian* a v rámci ní se v současnosti rozlišují ještě 2 podskupiny a to *Iranian 1* a *Iranian 2* (Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021).

Genetická informace TuMV obsahuje 44 rekombinačních míst. Rozmístění rekombinačních míst mezi genetickou informací kódující jednotlivé proteiny je popsáno v tabulce č.1.

Tabulka č. 1: Rozmístění rekombinačních míst. V prvním řádku jsou proteiny kódované nukleotidovou sekvencí viru. V druhém řádku počet rekombinačních míst.

P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa	NIb	CP
7	7	2	0	11	2	6	3	2	4

3.7 Geny rezistence proti TuMV u *Brassicaceae*

Rostliny dokáží bojovat proti infekci pomocí geneticky podmíněné rezistence. Člověkem byla rezistence rostlin proti virům používaná u plodin už od 70. let minulého století. První objevený gen způsobující rezistenci rostliny k TuMV byl objeven u salátu (*Lactuca sativa*) a pojmenován *Tu* gen (Palukaitis et al., 2021).

Geny rezistence proti TuMV u tuřínu (*B. napus*)

První popsany dominantní gen rezistentní proti TuMV u tuřínu byl *Tum* gen, který nebyl dále zkoumán. První zmapovaný gen byl *TURB01* (*TuMV Resistance in Brassica 01*). Tento gen vyvolává extrémní rezistenci k patotypu 1 TuMV. Rostlin s tímto genem nemohou být nikdy

infikovány. Pokud je u viru v proteinu CI mutace *TURB01* přestává působit (Palukaitis et al., 2021).

Dominantní gen *TURB02* vyvolává kvantitativní rezistenci rostliny k asijským izolátům patotypu 1 TuMV. Gen *TURB03* je vyvolává rezistenci vůči některým izolátům patotypu 3 a 4. Geny *TURB04* a *TURB05* vytváří u rostlin extrémní rezistenci k některým izolátům patotypů 1 a 3, ale pouze pokud genom rostliny obsahuje oba tyto geny (Palukaitis, 2021).

Geny rezistence proti TuMV u čínské zeli (*B. rapa* var. *rapa* sk. *Chinensis*)

U čínské zeli je několik dominantních i recesivních genů rezistence proti TuMV. Dominantní geny *Tu1* a *Tu2* vyvolávají rezistenci proti linii C4 u mladých rostlin čínské zeli. Dominantní geny *Tu3* a *Tu4* vyvolávají rezistenci proti TuMV u dospělých rostlin. Další geny vytvářející rezistenci jsou například *TuR1*, *TuR2*, *TuR3* a *TuR4* (Palukaitis et al., 2021).

Zajímavostí jsou dva geny nalezené u čínské zeli linie RLR22, mezi kterými je epistatický vztah. Tyto geny vyvolávají rezistenci vůči patotypům 1, 3, 4, 7, 8, 9 a 12. Jedná se o geny *ConTR01* (*Conditional TuMV Resistance 01*) a *retr01* (*recessive TuMV resistance 01*). *ConTR01* je dominantní a *retr01* je recesivní gen k němu epistatický (Palukaitis et al., 2021).

Dalšími recesivními geny vyvolávajícími rezistenci jsou *rnt1-1*, *rnt1-2* a *rnt1-3*. Kromě genů, u kterých je již potvrzeno, že mají vliv na rezistenci rostliny, existují i tzv. kandidáti na geny, které by mohly působit na rezistenci. Tímto kandidátem je například dominantní gen *BcTuR3* (Palukaitis et al., 2021).

3.8 Kontrola a management TuMV

Existuje mnoho možností, jak omezovat šíření TuMV u hospodářských rostlin. Většina je ovšem drahá a časově náročná. První možností je použití insekticidů pro usmrcení mšic a tím zabránění rychlého šíření viru. Tento způsob se používá běžně, ale většinou se používá spíše na hubení mšic kvůli jejich přímému poškození plodin. Pro omezování šíření viru není příliš úspěšný. Používané insekticidy ve většině případů neusmrtí mšice dost rychle, a dokonce byly popsány i případy, kdy se díky insekticidům zvýšila rychlost šíření viru mezi rostlinami, protože způsobily zvýšení pohybu a sací aktivity mšic. Navíc se díky častému používání insekticidů vytvořila u mšic rezistence. Na druhou stranu, pokud se selektivně použije vhodný insekticid, dokáže zabránit sekundárním šířením viru (Nellist et al., 2021; Shattuck, 1992; Walsh a Jenner, 2002).

U planě rostoucích rostlin existuje křížová ochrana. Princip této ochrany spočívá v tom, že pokud už je rostlina nakažená jedním kmenem viru a jeví pouze mírné příznaky, nemůže být nakažena jiným virulentním kmenem. Bylo zjištěno, že některé kmeny *Tabacco mosaic virus* (virus tabákové mozaiky) dokáží ochránit rostlinu před TuMV (Shattuck, 1992).

Další metodou ochrany plodin je použití genů zvyšujících rezistenci rostlin. Mnohé tyto geny, ale ne všechny, už jsou zmapovány. U rostlin se může zvýšit jejich rezistence šlechtěním, tedy vzájemným křížením jednotlivých linií plodiny. Kromě šlechtění je také možnost využít genového inženýrství. Při genovém inženýrství se do genomu rostliny vkládají geny zvyšující rezistenci od příbuzných druhů. Mohou se vkládat geny od sexuálně kompatibilních i nekompatibilních druhů. V genovém inženýrství se také používá metoda, při které se umlčují části virové RNA použitím exprese sekvencí z různých zdrojů, hlavně z modelových organismů. Metody genetických modifikací nejsou v Evropě dobře přijímány a jejich schvalování je komplikované a trvá mnoho let (Nellist et al., 2021; Shattuck, 1992; Walsh a Jenner, 2002).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K analýze byly použity 2 vzorky odebrané z rostlin napadnutých TuMV. Lokality, ze které tyto vzorky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Seznam analyzovaných vzorků.

Označení vzorku	Lokalita odběru	Hostitelská rostlina
TuMV29	Farma NAPOLI, Jistebník	tuřín (<i>B. napus</i> , cv. Eleanor)
GZ42	Kláštevní Lhota	<i>Armoracia rusticana</i>

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza I (Amresco, kat. č. 0710-500G)
- β -merkptoethanol (Serva, kat. č. 28625)
- BioScript™ Reverse Transcriptase (Bioline, kat. č. BIO-27036)
- Deionizovaná voda (připravována v laboratoři)
- Ethanol (98,2 %) (Lach-Ner, kat. č. 20025)
- Ethidium bromid (Biotium, kat. č. 40042)
- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0323)
- Isopropanol (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0)
- MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline, kat. č. 21108)
- Random hexamer primers (Promega, kat. č. C118A)
- UntraPure™ Calf Thymus DNA Solution (Invitrogen™, kat. č. 15633019)

Primery:

Tabulka č. 3: Použité primery

Primer	Sekvence 5'-3'	Tc	PCR produkt
CI-F	GAGAACATATCAGTGCTTGARGGA	52°C	2060 nt
Nib-R	TCTTCYTTTCATCTCRGGTGTGAACTC		
P3-F	CGATTTAGGCGGCAGATACAGCG	54°C	2414 nt
CI-RCZ	TCCYTCAAGCACTGATATGTTCTC		
Nib-F	GAGTTCACACCCYGAGATGAARGAAGA	54°C	2222 nt
UTR-R	TTTTTTTTTTTTTTTTTGTCCCTTGCATCCTATCAAATG		

Použité roztoky

- 70% ethanol (701,4 ml 99,8% ethanolu doplnit do 1 000 ml dH₂O)
- 1x TAE pufr (20 ml 50x TAE doplnit do 1 000 ml dH₂O)

Použité soupravy

- Nucleospin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28706)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Biofuge pico (Heraus)
- Elektroforetická komora HU10 MINI (Scie-Plas)
- Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hoefer)
- Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)
- Laboratorní váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Minicentrifuga PRISM™ mini (Labnet International, Inc.)
- Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific™)
- Power Station 300 (Labnet)
- Thermocycler T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD)
- UV transiluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Zdroj stejnosměrného proudu MP-250V (Major Science)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA z rostlinného materiálu

Celková RNA byla izolována pomocí Nucleospin RNA Plant kitu postupem stanoveným výrobcem. 50 mg rostlinného materiálu bylo homogenizováno ve zkumavce s 350 μ l RA1 a 3,5 μ l β -merkptoethanolu pomocí homogenizátoru FastPrep-24 třepáním o rychlosti 4,0 m/s 20 sekund. Následně byl lyzát aplikován na filtr s fialovým označením Place Nucleospin Filtr, který byl vložen do sběrné zkumavky a centrifugován 1 min při 13000 rpm. Filtrát byl přenesen do 2ml zkumavky a bylo k němu přidáno 350 μ l 70% ethanolu. Kvůli promíchání byla zkumavka následně zvortexována. Lyzát byl přenesen na silikonovou membránu kolonky Nucleospin RNA Plant Column a centrifugován 30 s při 13000 rpm. Kolonka byla vložena do nové zkumavky a na silikonovou membránu bylo nanášeno 350 μ l MDB, následně byla

zkumavka s kolonkou centrifugována 1 min při 13000 rpm, kvůli vysušení membrány. Na střed membrány kolonky bylo napipetováno 95 μ l DNasy, která byla připravena smícháním 10 μ l DNaseI a 90 μ l DNase reakčního pufru, a vzorek byl inkubován při pokojové teplotě 15 min. Po uplynutí doby se promývala membrána kolonky. Při prvním promytí se na kolonku nanoslo 200 μ l RA2 a zkumavka se centrifugovala 30 s při 13000 rpm. Kolonka byla přemístěna do nové zkumavky. Při druhém promytí se na kolonku nanoslo 600 μ l RA3 a centrifugovalo se 30 s při 13000 rpm. Filtrát se odstranil ze sběrné zkumavky. Při třetím promytí se na kolonku nanoslo 250 μ l RA3 a centrifugovalo se 2 min při 13000 rpm. Kolonka se centrifugovala znovu 2 min při 13000 rpm kvůli úplnému vysušení, následně byla kolonka přenesena do nuklease-free 1,5 ml mikrozukavky. Z kolonky se vymyla čistá RNA nanesením 60 μ l RNase-free vody na kolonku a centrifugací 1 min při 13000 rpm. Mikrozukavky s RNA byly umístěny do ledu a koncentrace DNA se stanovila pomocí Nanodrop 1000.

4.4.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce se používá pro přepis RNA na cDNA. Reverzní transkripce se prováděla ve dvou krocích za použití BioScript™ Reverse Transcriptase kitu a random primerů. V prvním kroku byla vytvořena reakční směs I, která se skládala pro jeden vzorek z 3,6 μ l DEPC H₂O, 1 μ l 10mM dNTPs a 0,4 μ l random primerů. Tato směs měla celkový objem 5 μ l a přidalo se k ní 5 μ l vzorku RNA o koncentraci 300 až 500 ng/ μ l. Vzorky s reakční směsí I se inkubovaly v termocykléru 5 min při 70 °C a poté se ihned přidaly na 5 min do ledu. Po uplynutí dané doby byla přidána reakční směs II. Reakční směs II obsahovala 4 μ l DEPC H₂O, 4 μ l 5x RT pufru, 1 μ l RNAsin a 1 μ l BioScript RT Pol. Celkový objem byl 10 μ l pro jeden vzorek. Po přidání reakční směsi II byly zkumavky vloženy do termocykléru, kde se inkubovaly 10 min při 25 °C, následně 30 min při 42°C a nakonec 5 min při 85 °C. Výsledná cDNA byla dále skladována při -20 °C.

4.4.3 PCR reakce

PCR byla provedena pomocí MyTaq Red DNA polymerase. Reakční směs se skládala z 5 μ l 5x MyTaq Red pufru, 15,8 μ l vody, 0,5 μ l f primerů o koncentraci 20 pmol/ μ l, 0,5 μ l r primerů o koncentraci 20 pmol/ μ l a 0,2 μ l Taq pol o koncentraci 5U/ μ . K reakční směsi byly přidány 3 μ l vzorku cDNA. Celkový objem reakční směsi byl 25 μ l. Vzorek se vložil do termocykléru, kde proběhla PCR reakce podle podmínek uvedených v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Teplotní a časový průběh PCR

	Teplota (°C)	Počet opakování	Čas
Počáteční denaturace	94	1	2 min
Denaturace	94	35	30 s
Annealing	52		30 s
Elongace	72		2 min
Konečná elongace	72	1	5 min

4.4.4 Izolace PCR produktu z gelu

Na izolaci byl použit QIAquick Gel Extraction Kit podle postupu stanoveného výrobcem. Byl připraven 1% agarózový gel s EtBr. Gel byl nalit do elektroforetické vaničky, do které byl vložen hřebínek a nechal se ztuhnout. Po ztuhnutí se vanička vložila do elektroforetické komůrky, hřebínek se odstranil. Gel byl převrstven 1% TAE pufrem a do jednotlivých jamek byl napipetován PCR produkt. Do první jamky byly napipetovány 2 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Elektroforetická separace začala na 60 V a pokračovala na 80 V.

Po skončení elektroforezy se gel vložil na UV transiluminátor a sterilním skalpelem se vyřezávaly jednotlivé PCR produkty. Každý PCR produkt se vložil do vlastní 1,5 ml zkumavky. Poté se jednotlivé PCR produkty ve zkumavkách zvážily a podle jejich váhy byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1. Zkumavky se inkubovaly 10 min při 50 °C do kompletního rozpuštění v dry-bloku. Po rozpuštění byl přidán 1 objem izopropanolu a směs se napipetovala do kolonky pro izolaci DNA. Kolonka se vzorkem se centrifugovala 1 min při 13000 rpm, co protéklo bylo vylito. Do kolonky bylo přidáno 500 µl QG pufru a centrifugovalo se 1 min při 13000 rpm, co protéklo bylo vylito. Do kolonky se přidalo 750 µl PE pufru a centrifugovalo se 1 min při 13000 rpm, poté se vylilo, co protéklo a centrifugovalo se 1 min při 13000 rpm. Kolonka se umístila do nové zkumavky a napipetovalo se do ní 30 µl deionizované vody. Centrifugovalo se 1 min při 13000 rpm. Koncentrace izolované DNA se zjistila pomocí fluorimetru. Izolované DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

4.4.5 Bioinformatická analýza

Získaná sekvenční data byla poskládána pomocí Alignment Explorer v programu Mega 7.0. Sekvence izolátů TuMV29 a GZ42 byly poskládány ze 6 segmentů. Dva segmenty byly získány

pomocí primerů CI-F/Nib-R a Nib-F/UTR-R. Čtyři segmenty byly poskytnuty pracovníky laboratoře. Správnost byla potvrzena přiřazením získané sekvence k podobné sekvenci jiného izolátu TuMV. U izolátu GZ-42 to byla sekvence izolátu CAR37 a u izolátu TuMV29 to byly sekvence izolátů HC-9 a CZE5.

S pomocí referenční sekvence (NC_002509.2) se v programu Mega 7.0 u obou zkoumaných sekvencí vyznačily čtecí rámce a poloha proteinů kódovaných nukleotidovou sekvencí.

Zkoumané sekvence byly porovnány se sekvencemi českých i zahraničních izolátů, které byly vyhledány v databázi GenBank. Pomocí metody Neighbor-joining (Mega 7.0) byly zjištěny jejich fylogenetické vztahy a pomocí funkce Tree Explorer (Mega 7.0) byly sestaveny fylogenetické stromy.

Pomocí funkce pairwise distances (Mega 7.0) byly zjištěny distance jednotlivých sekvencí, které byly následně přepočteny na procentuální identitu.

5 Výsledky

Cílem experimentální části byla molekulárně genetická charakteristika izolátů TuMV z České republiky. Zpracovány byly 2 izoláty TuMV: TuMV29 z rostliny tuřinu (*B. napus*, cv. Eleanor) a GZ42 z rostliny *Armoracia rusticana*.

Pomocí RT-PCR se specifickými primery a sekvenování byly získány úseky DNA. Tyto úseky byly seřazeny v programu Mega pomocí kompletní genomické sekvence geneticky podobného izolátu TuMV. Pro sestavení sekvence izolátu TuMV29 byla použita jako reference sekvence CAR37 (DQ648592.1), pro sestavení sekvence izolátu GZ42 byly jako reference použity sekvence HC9 (MH469725.1) a CZE5 (AB252107.1) Chybějící úseky byly doplněny pomocí zpracovaných sekvencí poskytnutých katedrou. U sekvence izolátu GZ42 byly doplněny chybějící úseky nacházející se v lokacích: 748 – 1181, 1455 – 1534, 3194 – 4178 a 4942 – 5288 v nukleotidové sekvenci. U sekvence izolátu TuMV29 byly doplněny chybějící úseky nacházející se v lokacích: 3164 – 3204 a 5913 – 6375 v nukleotidové sekvenci.

Byla získána sekvence pokrývající kódující oblast obou izolátů TuMV. Nukleotidová sekvence izolátu TuMV29 byla dlouhá 9772 nukleotidů a délka nukleotidové sekvence GZ-42 byla 9753 nukleotidů. Pro zjištění čtecích rámců a pozic jednotlivých nukleotidy kódovaných proteinů byly genomické sekvence byly porovnány s referenční sekvencí (NC_002509.2) Bylo zjištěno, že čtecí rámec ORF1 začíná na 131 nukleotidu a končí na 9625 nukleotidu. ORF1 u izolátů TuMV obsahuje 3164 aminokyselin a stop kodon. Byly zjištěny také pozice a délky všech jednotlivých proteinech a výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Z 5' konce první protein je protein P1, který je kódovaný 1 086 nukleotidy a začíná zároveň se čtecím rámcem ORF1. Ihned za ním, v pořadí druhý se nachází protein HC-Pro, který je kódovaný 1 374 nukleotidy. Následuje protein P3 kódovaný 1065 nukleotidy. V sekvenci proteinu P3 se vyskytuje druhý čtecí rámec PIPO (ORF2) dlouhý 180 nukleotidů se stop kodonem. Nejdelší protein v rámci genomu je CI protein kódovaný 1932 nukleotidy. CI protein je z obou stran ohraničen krátkými proteiny 6K1 a 6K2, které jsou kódovány 156 a 159 nukleotidy. Následuje protein NIa-VPg kódovaný 576 nukleotidy a protein NIa-Pro kódovaný 729 nukleotidy. Druhý nejdelší protein v genomické sekvenci je NIb protein, který je kódovaný 1551 nukleotidy. Z 3' konce je jako první protein CP kódovaný 864 nukleotidy.

Tabulka č. 5: Charakteristika čtecích rámců ORF1 a ORF2 (PIPO) a jednotlivých proteinů izolátů TuMV29 a GZ42.

Označení	Nukleotidová pozice	Aminokyselinová pozice	Počet aminokyselin
Čtecí rámec ORF1	131 - 9625	0 - 3164	3164 + STOP
Protein P1	131 - 1216	1 - 362	362
Protein HC-Pro	1217 - 2590	363 - 820	458
Protein P3	2591 - 3655	821 - 1175	355
Protein 6K1	3656 - 3811	1176 - 1227	52
Protein CI	3812 - 5743	1228 - 1871	644
Protein 6K2	5744 - 5902	1872 - 1924	53
Protein Nia-VPg	5903 - 6478	1925 - 2116	192
Protein Nia-Pro	6479 - 7207	2117 - 2359	243
Protein Nib	7208 - 8758	2360 - 2876	517
Protein CP	8759 - 9622	2877 - 3164	288
Čtecí rámec ORF2 (PIPO)	3079 - 3261	984 - 1043	60 + STOP

U studovaných izolátu TuMV29 a GZ42 byla zjištěna jejich podobnost s jinými izoláty TuMV z České republiky i ze světa. Výsledné porovnání nukleotidových sekvencí kompletních genomů je vyobrazeno v tabulce č. 6. Oba izoláty vykazovaly největší identitu s izoláty skupiny World-B. Vysoká podobnost byla hlavně s českými izoláty a s izoláty z evropských zemí.

Izolát TuMV29 vykazoval největší identitu v nukleotidové sekvenci s izolátem POL1 a to 96,5%. Vysoká identita v nukleotidové sekvenci byla zjištěna s českými izoláty CZE4 a CZE 8. U obou izolátů byla identita 96,3 %. Vysokou identitu k TuMV29 v hodnotě 95,2 % vykazoval také izolát HUN1. S většinou zkoumaných izolátů vykazoval TuMV29 identitu v rozmezí 84,1 – 88,9 %. Nejnižší identitu v nukleotidové sekvenci 72,4% vykazoval izolát ORM patřící do skupiny Orchis. Nízká identita 75,4% byla zjištěna také u izolátu PK1 patřící do skupiny Basal-B.

Izolát GZ42 vykazoval nejvyšší identitu v nukleotidové sekvenci 94,2 % i izolátem CAR37. Vysoká identita 93,8% byla zjištěna také u nukleotidových sekvencí izolátů CZE2 a UK1. Identita nad 93 % byla zjištěna u nukleotidových sekvencí izolátů CZE11 a CZE12 a identita nad 92 % byla zjištěna u nukleotidových sekvencí izolátů Ningbo, GD, AHBL a ZH1. Nejnižší identita byla stejně jako u izolátu TuMV29 s izoláty ORM a PK1. Nukleotidová sekvence ORM vykazovala identitu 71,9 % a nukleotidová sekvence PK1 75,4 %.

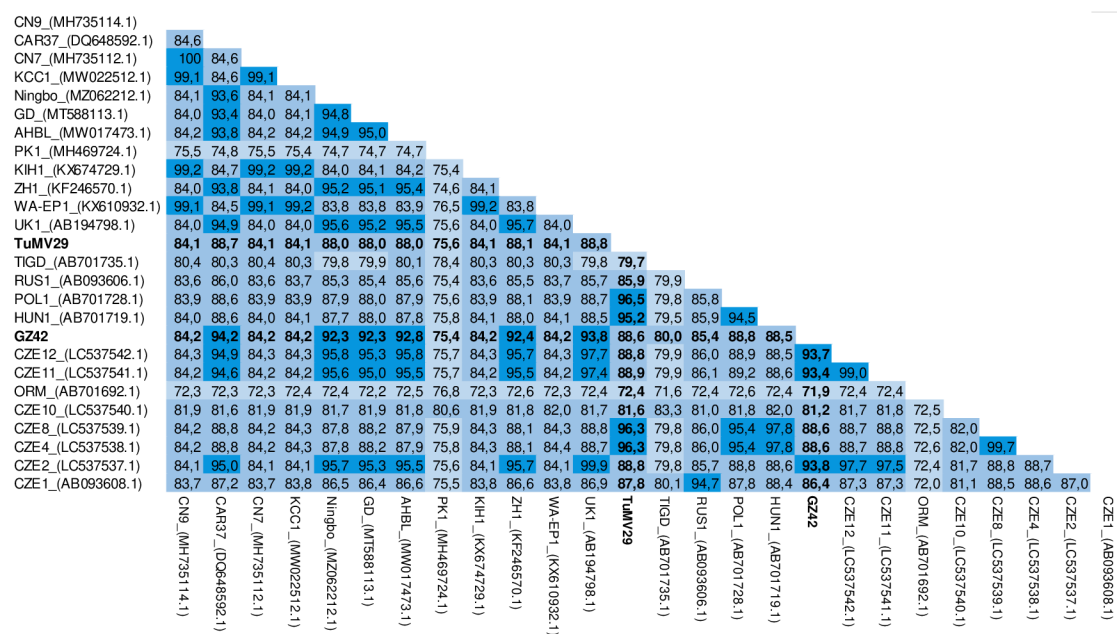
Kromě nukleotidových sekvencí byla u obou izolátů zkoumána i identita odvozených aminokyselinových sekvencí. Procentuální výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 7. Stejně jako u nukleotidových sekvencí jsou sekvence nejvíce podobné izolátům skupiny World-B.

V odvozené aminokyselinové sekvenci vykazoval izolátem TuMV29 nejvyšší identitu se sekvencí HC-9 a to 99,7 %. Vysokou identitu vykazovaly také aminokyselinové sekvence českých izolátů CZE4 a CZE8. Identitu 98,5 vykazovala aminokyselinová sekvence POL1. Nejnižší identitu v aminokyselinové sekvenci vykazoval stejně jako v nukleotidové sekvenci izolát ORM patřící do skupiny Orchis. ORM vykazoval identitu 80,2 %. Nízkou identitu měli také aminokyselinové sekvence izolátů PK1 a TIGD. Izolát PK1 vykazoval identitu v rámci aminokyselinové sekvence 83,0 % a izolát TIGD 88,4 %.

Izolát GZ42 vykazoval nejvyšší identitu v aminokyselinové sekvenci s izolátem CAR37 v procentuální hodnotě 96,5 %. Vysoká nad 95 % byla zjištěna také u aminokyselinových sekvenci izolátů GD, CZE2 a UK1. U izolátu GD byla zjištěna identita 95,4 %, u izolátu CZE2 95,6 % a u izolátu UK1 95,5 %. Nejnižší identitu 79,2 % vykazovala aminokyselinová sekvence izolátu ORM. Druhá nejnižší identita 82,1 % byla zjištěna také u aminokyselinové sekvence PK1. Nízkou identitu vůči GZ42 vykazovaly také aminokyselinové sekvence TIGD a CZE10, a to v hodnotách 87,9 % a 89,7 %.

Nukleotidové sekvence zkoumaných izolátů GZ42 a TuMV29 vůči sobě vykazovaly identitu 88,6 % a aminokyselinové sekvence těchto izolátů vykazovaly identitu 94,7 %.

Tabulka č. 6: Analýza identity sekvencí pokrývajících kódující oblast izolátů TuMV v procentech [%]. Pomocí barevné škály je zaznačena míra identity mezi sekvencí. Čím světlejší je značení pole, tím je identita mezi sekvencemi nižší. Studované izoláty TuMV29 a GZ42 jsou zvýrazněny tučně.



Tabulka č. 7: Analýza identity aminokyselinových sekvencí izolátů TuMV v procentech [%]. Pomocí barevné škály je zaznačena míra identity mezi sekvencí. Čím světlejší je značení pole, tím je identita mezi sekvencemi nižší. Studované izoláty TuMV29 a GZ42 jsou zvýrazněny tučně.

GZ42	TuMV29	CAR37_(ABG43021.1)	HC9_(AXS76845.1)	WA-EP1_(APX54486.1)	TIGD_(BAM99253.1)	FRA2_(BAM99226.1)	HUN1_(BAM99237.1)	PK1_(AXS76844.1)	GD_(QYF11819.1)	Ningbo_(QZW25193.1)	KCC1_(UBV46712.1)	CZE10_(BCD42166.1)	CZE8_(BCD42165.1)	CN7_(QBQ58061.1)	CZE5_(BAF31152.1)	CZE4_(BCD42164.1)	CZE2_(BCD42163.1)	CZE1_(BAC79405.1)	ORM_(BAM99210.1)	POL1_(BAM99246.1)	RUS1_(BAC79403.1)	UK1_(BAD69823.1)				
94,7		96,5	95,0																							
	94,7	94,8	99,7	95,1																						
		92,1	92,5	92,9	92,6																					
			87,9	88,4	88,5	88,5	89,3																			
				94,9	96,3	95,2	98,4	92,8	88,7																	
					94,5	98,0	95,0	98,1	92,8	88,5	97,6															
						82,1	83,0	82,9	83,2	84,0	84,2	83,3	83,1													
							95,4	95,2	96,1	95,4	92,8	88,5	95,2	95,2	82,8											
								94,7	94,4	95,6	94,5	92,9	88,0	94,5	94,5	82,6	97,0									
									92,1	92,5	92,8	92,5	99,4	89,2	92,8	92,7	83,9	92,7	92,9							
										89,7	90,9	90,5	91,1	91,8	91,2	91,2	91,0	86,4	90,8	90,3	91,6					
											94,6	98,6	95,2	98,7	92,8	88,5	97,8	98,8	82,9	95,4	94,7	92,8	91,0			
												92,0	92,4	92,7	92,5	99,3	89,2	92,7	92,7	83,9	92,7	92,8	99,3			
													94,7	98,5	95,1	98,5	92,6	88,5	98,2	97,8	83,0	95,2	94,6			
														94,6	98,6	95,2	98,7	92,8	88,6	97,8	98,9	82,9	95,4			
															95,6	95,4	96,8	95,5	93,1	88,3	95,5	95,7	82,9			
																93,1	93,8	94,2	94,0	92,4	88,2	94,1				
																	79,2	80,2	79,7	80,3	80,4	78,2				
																		94,9	98,5	95,3	98,6	92,8	88,6			
																			93,1	93,4	94,0	93,5	92,5			
																				95,5	95,4	96,7	95,5			
																					93,1	88,3	95,4			
																						88,3	95,4			
																							97,7			
																								97,3		
																									93,1	
																										93,0
																										95,7
																										93,0
																										93,0
																										95,7
																										93,0
																										93,0
																										95,7
																										93,7

Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza byla provedena za pomoci programu Mega 7.0. Porovnávány byly kompletní nebo téměř kompletní genomové nukleotidové sekvence a poté i aminokyselinové sekvence. Zkoumané izoláty TuMV29 a GZ42 byly porovnávány s českými i zahraničními izoláty viru TuMV z fylogenetických skupin Orchis, Basal-B, Basal-BR a World-B.

Z nukleotidových i aminokyselinových sekvencí byly sestaveny fylogenetické stromy pomocí metody Neighbor-Joining. Jako outgroup byl použit izolát ORM. Sekvence, které byly použity a informace o jejich hostitelských rostlinách a zemích původu jsou vypsány v tabulce č. 8.

Pomocí fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že izoláty TuMV29 i GZ42 patří do skupiny World-B. Izolát GZ42 vytvořil větev s izolátem CAR37, a to v nukleotidovém i aminokyselinovém fylogenetickém stromu. Izolát CAR37 byl získán v Polsku z rostliny *Armoracia rusticana*, pochází ze stejného druhu rostliny jako GZ42 a nebyl odebrán daleko od místa výskytu GZ42. Ve fylogenetickém stromu sestaveném pomocí nukleotidových sekvencí vytvořili izoláty, které byly po CAR37 izolátu GZ42 nejbližší větev, která byla rozdělena na dvě skupiny. První skupinu v rámci této větve vytvořili izoláty, které původem pocházely z Evropy, a to hlavně z České republiky. Byly to izoláty CZE2, CZE11, CZE12 a UK1. Izoláty byly

získány z různých rostlinných druhů, jak lze vidět v tabulce č. 8, a tedy je spojovalo spíše místo výskytu. Druhá skupina, která je vytvořena na této větvi je zajímavá tím, že se nejedná o evropské izoláty, ale o izoláty pocházející z Asie, konkrétně z Číny, které byly získány z odlišných druhů rostlin.

Izolát TuMV29 taktéž vytvořil větev s izolátem získaným z Polska, a to konkrétně s izolátem POL1. Izoláty TuMV29 i POL1 byly oba získány z hostitelských rostlin *Brassica napus*. Nejblíže k TuMV29 se vytvořila z izolátů HUN1, CZE4 a CZE8. Mezi izoláty fylogeneticky nejbliže k TuMV29 tedy patří pouze evropské izoláty. Celkový nukleotidový fylogenetický strom je zobrazen na obrázku č. 3.

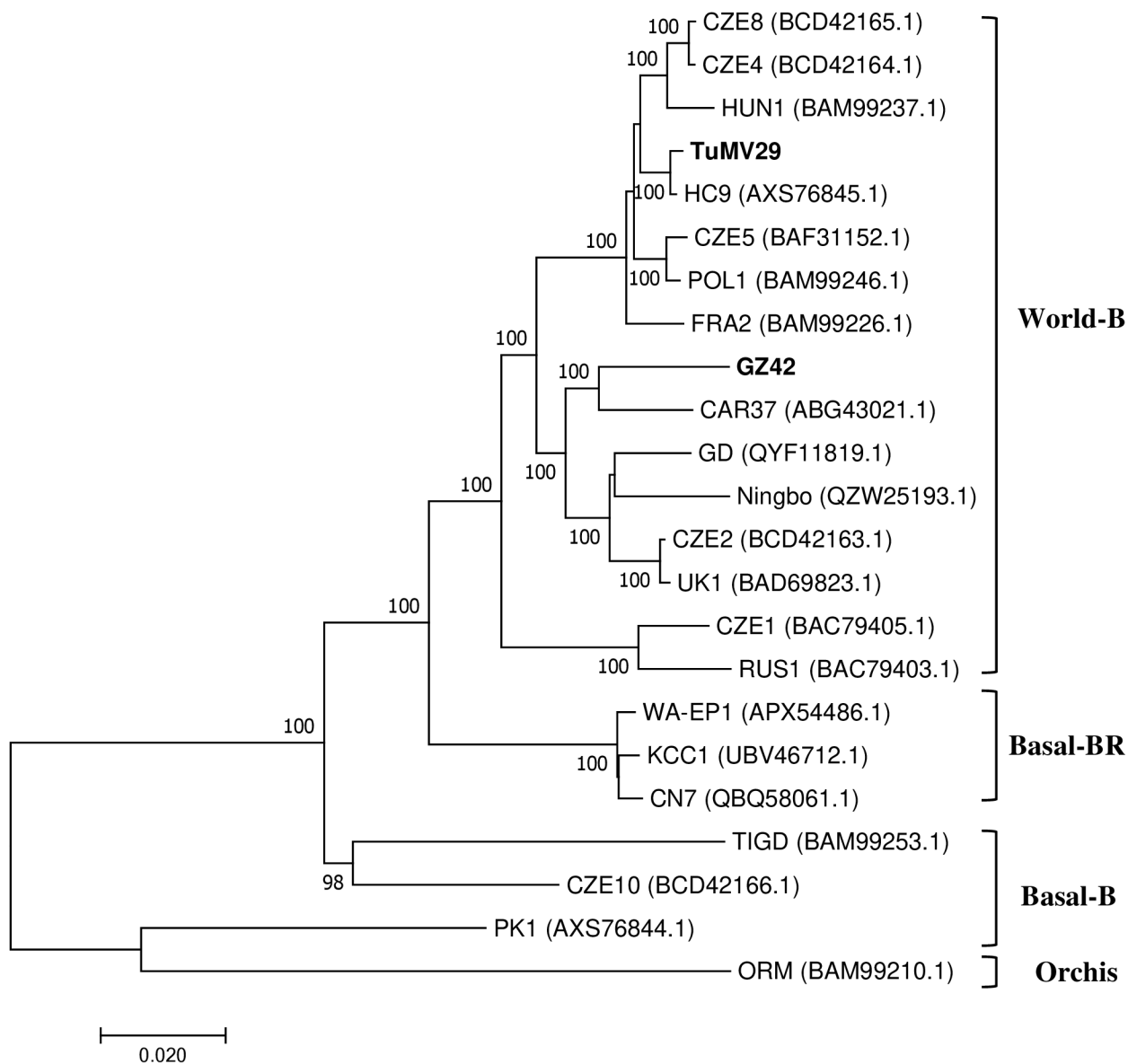
Na obrázku č. 4 je zobrazen aminokyselinový strom se zkoumanými izoláty GZ42 a TuMV29. Mnoho použitých referenčních sekvencí je totožných s těmi v nukleotidovém fylogenetickém stromu, některé jsou však rozdílné.

V aminokyselinovém fylogenetickém stromu vytvořil izolát TuMV29 skupinu společně s evropskými izoláty CZE8, CZE4, HUN1, HC9, FRA2, CZE5 a POL1. Nejbliže má izolát TuMV29 k izolátu HC9 pocházejícího ze Slovenska získaného z rostliny *Papaver somniferum*. Izolát GZ42 vytvořil v aminokyselinovém fylogenetickém stromě stejnou větev s izolátem CAR37 jako v případě nukleotidového fylogenetického stromu a jejich nejbližší zůstaly izoláty GD, Ningbo, CZE2 a UK1.

Nejvzdálenější větev kromě outgroup izolátu ORM u nukleotidového i aminokyselinového fylogenetického stromu vytvořili izoláty PK1, CZE10 a TIGD spadající pod fylogenetickou skupinu Basal-B. Mezi větví Basal-B a World-B se vytvořila větev s izoláty fylogenetické skupiny Basal-BR.

Tabulka č. 8: Referenční izoláty TuMV použité k fylogenetické analýze.

Fylogen. sk.	Izolát	Hostitelská rostlina	Země původu	Zdroj
Orchis	ORM (AB701692.1)	<i>Anacamptis morio</i>	Německo	Nguyen H. D. et al. (2013)
Basal-B	PK1 (MH469724.1)	<i>Papaver rhoeas</i>	Slovensko	Glasa M. et al. (2018)
	CZE10 (LC537540.1)	<i>Alliaria officinalis</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	TIGD (AB701735.1)	<i>Tigridia</i> sp.		Nguyen H. D. et al. (2013)
Basal-BR	CN7 (MH735112.1)	<i>Raphanus sativus</i>	Čína	Bez publikace
	CN9 (MH735114.1)	<i>Raphanus sativus</i>	Čína	Bez publikace
	KIH1 (KX674729.1)	<i>Raphanus sativus</i>	Jižní Korea	Bez publikace
	WA-EP1 (KX610932.1)	<i>Brassica napus</i>	Austrálie	Guerret M. G. L. et al. (2017)
	KCC1 (MW022512.1)	<i>Raphanus sativus</i>	Jižní Korea	Bez publikace
World-B	CZE1 (AB093608.1)	<i>Brassica oleracea</i>	ČR	Tomimura K. et al. (2003)
	RUS1 (AB093606.1)	<i>Armoracia rusticana</i>	Rusko	Tomimura K. et al. (2003)
	CZE4 (LC537538.1)	<i>Brassica pekinensis</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	CZE8 (LC537539.1)	<i>Brassica pekinensis</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	HUN1 (AB701719.1)	<i>Alliaria petiolata</i>	Maďarsko	Nguyen H. D. et al. (2013)
	POL1 (AB701728.1)	<i>Brassica napus oleifera</i>	Polsko	Nguyen H. D. et al. (2013)
	CAR37 (DQ648592.1)	<i>Armoracia rusticana</i>	Polsko	Kozubek E. et al. (2007)
	CZE11 (LC537541.1)	<i>Brassica oleracea</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	CZE12 (LC537542.1)	<i>Brassica oleracea</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	CZE2 (LC537537.1)	<i>Armoracia rusticana</i>	ČR	Kawakubo et al. (2020)
	UK1 (AB194798.1)	<i>Raphanus sativus</i>	Velká Británie	Tan Z. et al. (2005)
	Ningbo (MZ062212.1)	<i>Arachis hypogaea</i>	Čína	Li M. et al. (2022)
	AHBL (MW017473.1)	<i>Pseudostellaria heterophylla</i>	Čína	Bez publikace
	ZH1 (KF246570.1)	<i>Phalaenopsis</i> sp.	Čína	Bez publikace
	GD (MT588113.1)	<i>B. rapa var. parachinensis</i>	Čína	Bez publikace
	FRA2 (BAM99226.1)	<i>Brassica napus</i>	Francie	Nguyen H. D. et al. (2013)
	HC9 (MH469725.1)	<i>Papaver somniferum</i>	Slovensko	Glasa M. et al. (2018)



Obrázek č. 4: Aminokyselinový fylogenetický strom izolátů TuMV vytvořený metodou Neighbor-Joining v programu Mega 7.0. Jako outgroup byl použit izolát ORM (AB701692.1). Jsou zaznačeny bootstrap hodnoty vyšší než 70. Měřítka představuje 0,020 substitucí na pozici. Po pravé straně jsou izoláty rozděleny do fylogenetických skupin. Zkoumané izoláty jsou zvýrazněny tučně.

6 Diskuse

Turnip mosaic virus je celosvětově rozšířený hospodářsky důležitý virus napadající především brukvovité rostliny. Je rozlišeno mnoho různých izolátů, které se od sebe odlišují genetickou informací i vnějšími projevy. Pomocí fylogenetických analýz byly jednotlivé izoláty TuMV rozděleny do fylogenetických skupin i podskupin. Hlavní fylogenetické skupiny se nazývají World-B, Asian-BR, Basal-BR, Basal-B a Orchis (Tomimura et al., 2003; Nguyen et al., 2013; Nellist et al., 2021; Palukaitis a Kim, 2021). Fylogenetická skupina Orchis je od ostatních skupin nejvíce vzdálená a identita izolátů této skupiny, jako je například izolát ORM, a izoláty ostatních skupin je méně než 80 %. V Evropě převládá fylogenetická skupina World-B, mezi jejíž izoláty patří například POL1, CZE5, UK1 a FRA2.

V této práci byly porovnávány kompletní genomy dvou českých izolátů. Izolát GZ42 byl získán z rostliny *Armoracia rusticana* a TuMV29 byl získán z rostliny *Brassica napus*. Zkoumané izoláty byly porovnávány s českými i zahraničními izoláty pocházejícími z různých hostitelských rostlin. U zkoumaných izolátů byla zjištěna jejich nukleotidová sekvence, na které byly určeny čtecí rámce ORF1 a ORF2 (PIPO) a rozmístění sekvencí kódující jednotlivé proteiny viru. U získaných nukleotidových sekvencí byla zjištěna jejich podobnost k vybraným izolátům a byl sestaven fylogenetický strom. Nukleotidové sekvence byly poté převedeny na aminokyseliny a vzniklé aminokyselinové sekvence byly znovu porovnány s vybranými českými i zahraničními sekvencemi, byla zjištěna jejich identita a byl sestaven aminokyselinový fylogenetický strom.

Pomocí fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že izoláty GZ42 a TuMV29 patří do fylogenetické skupiny World-B.

V České republice byl TuMV poprvé zaznamenán roku 1990 na rostlinném druhu *Papaver somniferum* (Špak a Kubelková, 1990) a od té doby byl detekován na mnoho rostlinných druzích po celém území (Kawakubo et al., 2020; Tomimura et al., 2007; Walsh a Jenner; 2002). Obě sekvence, GZ42 i TuMV29, měly vysokou identitu s ostatními českými izoláty, kromě CZE10. Identita sekvencí českých izolátů se zkoumanými sekvencemi byla nejméně 81 % a ve většině případů se pohybovala kolem 90 %. V rámci českých izolátů měl izolát TuMV29 nejvyšší identitu s izoláty CZE4 a CZE8, se kterými byla jeho identita v nukleotidové sekvenci 96,3 %. Fylogenetický strom potvrdil blízkost těchto izolátů a jejich společný původ. Nejnižší identitu v rámci českých izolátů měl izolát TuMV29 s izolátem CZE10. Jeho identita byla

81,6 %. Izolát GZ42 měl největší identitu v rámci nukleotidových sekvencí českých izolátů s izolátem CZE2 a to 93,8 % a nejmenší identitu 81,2 % s izolátem CZE10.

I když oba izoláty měly vysokou identitu s českými izoláty, nejpodobnější jim byly izoláty získané v Polsku a na Slovensku (Glasa et al., 2018; Kozubek et al., 2007; Nguyen et al., 2013). Izolát TuMV29 vykazoval největší identitu v nukleotidové sekvenci s izolátem POL1. V nukleotidové sekvenci byla tato identita 96,5 % a v aminokyselinové sekvenci 98,5 %. Při aminokyselinové analýze byla zjištěna také velká podobnost se slovenským izolátem HC9. Při analýze nukleotidových sekvencí nebyl tento izolát HC9 použit, ale jeho identita 99,7 % v aminokyselinové sekvenci značí, že je nejbližší zkoumanému izolátu TuMV29 a že sekvence jsou téměř identické. Zatímco izoláty TuMV29 a POL1 byly získány z hostitelské rostliny *Brassica napus*, izolát HC9 byl získán z hostitelské rostliny *Papaver somniferum*, tedy z máku setého. Rostliny pocházející z jiné čeledi než *Brassica napus*. U sekvencí izolátů TuMV29 a POL1 může být podobnost způsobena stejným okruhem hostitelů. U sekvencí izolátů TuMV29 a HC9, které byly odebrány z hostitelských rostlin rozdílných čeledí by jejich velká podobnost mohla být způsobena blízkým místem výskytu a je pravděpodobné, že izoláty byly dříve sekvencně totožné a k jejich rozrůzněni došlo teprve nedávno. K tomuto rozdělení mohlo dojít například kvůli změně okruhu hostitelů jednoho z izolátů.

Izolát GZ42 je v rámci analýz nukleotidových i aminokyselinových sekvencí nejvíce podobný polskému izolátu CAR37. Tento izolát byl odebrán roku 2007, což značí, že za posledních 15 let se genetická informace TuMV příliš nezměnila (Kozubek et al., 2007). V rámci fylogenetických stromů spolu tvoří izoláty větev a jejich identita v nukleotidové sekvenci je 94,2 % a v aminokyselinové sekvenci je 96,5 %. Jejich vzájemná podobnost by mohla být způsobena blízkým místem odběru těchto izolátů a společným okruhem hostitelů. Oba izoláty byly získány z rostliny *Armoracia rusticana*.

Izoláty TuMV29 a GZ42 vykazují podobnost v nukleotidové sekvenci 88,4 % a v aminokyselinové sekvenci 94,7 %. Jejich vzájemnou podobnost mohl zvýšit odběr vzorků blízko u sebe, na území České republiky, a naopak snížit rozdílný okruh hostitelů.

V rámci České republiky patří většina izolátů do fylogenetické skupiny World-B, kam patří i oba zkoumané izoláty. Izolát TuMV29 je geneticky velmi podobný izolátům CZE4 a CZE8, u nichž bylo již dříve zjištěno, že patří do fylogenetické skupiny World-B. Stejně tomu je i u izolátu GZ42, který je geneticky velmi podobný izolátům CZE2, CZE11 a CZE12 patřících do fylogenetické skupiny World-B (Kawakubo et al., 2020). Jedinou výjimkou mezi českými izoláty je izolát CZE10, který byl v rámci fylogenetické analýzy zařazen do fylogenetické

skupiny Basal-B. Izolát CZE10 byl izolován z rodu *Allium* a díky tomu, že infikuje jednoděložné rostliny je jeho genetická informace rozdílná od ostatních českých izolátů (Kawakubo et al., 2020). Na rozdíl od České republiky jsou v Evropě přítomny téměř všechny fylogenetické skupiny. V Německu lze najít izoláty patřící i do fylogenetické skupiny Orchis, například izolát ORM. V Řecku se nacházející izoláty z fylogenetické skupiny Basal-B. Izoláty patřící do fylogenetické skupiny Basal-BR jsou kromě Asie také v Itálii a v Německu. Pouze výskyt fylogenetické skupiny Asian-BR nebyl zatím v Evropě potvrzen (Tomimura et al., 2004; Kawakubo et al., 2020).

7 Závěr

Byla analyzována genetická variabilita sekvencí dvou českých izolátů *Turnip mosaic virus*. Pomocí sekvenování byla získána sekvence pokrývající kódující oblast obou izolátů. U izolátu TuMV29 byla získána sekvence dlouhá 9772 nukleotidů a u izolátu GZ42 sekvence dlouhá 9753 nukleotidů, v obou případech zahrnovala čtecí rámce ORF1 a ORF2. Bylo zjištěna podobnost izolátů k českým i zahraničním izolátům a oba izoláty byly zařazeny do fylogenetické skupiny World-B. Izolát TuMV29 vykazoval nejvyšší identitu se slovenským izolátem CN-9 (99,7 % v odvozených aminokyselinových sekvencích) a s polským izolátem POL1 (96,5 % v nukleotidových sekvencích). Izolát GZ42 vykazoval nejvyšší identitu s polským izolátem CAR37 (94,2 % v nukleotidových sekvencích, 96,5 % v odvozených aminokyselinových sekvencích). Pomocí fylogenetické analýzy byly zkonstruovány fylogenetické stromy. Izolát GZ42 vytvořil větev s izolátem CAR37. Izolát TuMV29 vytvořil větev s izolátem POL1 v nukleotidovém stromě a s izolátem HC-9 v aminokyselinovém stromě. Fylogenetické stromy potvrdily evoluční příbuznost izolátů zjištěnou studiem vzájemných identit.

8 Literatura

- Adachi S., Honma T., Yasaka R., Ohshima K., Tokuda M. (2018): Effects of infection by Turnip mosaic virus on the population growth of generalist and specialist aphid vectors on turnip plants. *PLoS ONE* 13(7): 1–8.
- Carden, P. W., Gladders, P. (1984): Pest and disease control on brassicas and root vegetables. Lion House, Alnwick, England: Ministry of Agriculture Fisheries and Food Booklet 10.
- Costa H., Ventura J. A., Jadão A. S., Rezende J. A. M., Mello A. P. O. A. (2010): First Report of Turnip mosaic virus on Watercress in Brazil. *Plant Dis.* 2010 Aug;94(8): 1066.
- Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Cartón, D. et al. (2019): Structure of Turnip mosaic virus and its viral-like particles. *Sci Rep* 9, 15396.
- Chivasa, S., Ekpo, E. J. A., Hicks, R. G. T. (2002): New hosts of Turnip mosaic virus in Zimbabwe. *Plant Pathology*, 51(3): 386.
- Choi, J. K., Matsuyama N., Wakimoto S. (1979): Properties of ribonucleic acid isolated from turnip mosaic virus. 2. Nucleotide composition and hyperchromicity by chemical and thermal denaturation. *Annu. Phytopath. Soc. Japan* 45: 358-361.
- Fischer H. U., Lockhart B. E. L. (1976): A Moroccan isolate of turnip mosaic virus infectious to garden pea and other legumes. *Plant Disease Reporter*, 60(5): 398-401.
- Glasa M., Šoltys K., Predajňa L., Sihelská N., Nováková S., Šubr Z., Kraic J., Mihálik D. (2018): Molecular and Biological Characterisation of Turnip mosaic virus Isolates Infecting Poppy (*Papaversomniferum* and *P. rhoeas*) in Slovakia. *Viruses*, 10(8):430.
- Green, S. K., Deng, T. C. (1985): Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts Taiwan. *Plant Dis.* 69: 28-31.
- Guerret M. G. L., Nyalugwe E. P., Maina S, Barbetti M. J., van Leur J. A. G., Jones R. A. C. (2017): Biological and Molecular Properties of a Turnip mosaic virus (TuMV) Strain that Breaks TuMV Resistances in *Brassica napus*. *Plant Disease*, 101: 674-683.
- Gungoosingh A., Madhu S. P. B., Dumur D. (2001): First report of Turnip mosaic virus in watercress in Mauritius. *Plant Disease*, 85(8): 919.

- Honjo M.N., Emura, N., Kawagoe, T. et al. (2020): Seasonality of interactions between a plant virus and its host during persistent infection in a natural environment. *ISME J* 14: 506–518.
- Jenner C. E., Walsh J. A. (1996): Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology*, 45: 848-856.
- Kawakubo S., Gao F., Li S., Tan Z., Huang Y., Adkar-Purushothama Ch. R., Gurikar Ch., Maneechoat P., Chiemsoombat P., Aye S. S., Furuya N., Shevchenko O., Špak J., Škoric D., Ho S. Y. W., Ohshima K. (2020): Genomic analysis of the brassica pathogen turnip mosaic potyvirus reveals its spread along the former trade routes of the Silk Road. *Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America*, 118 (12).
- Kegler H., Ehrig F., Rabenstein F. F. (1998): Evidence of a plant virus in Iceland. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*. 31. 241-246.
- Kozubek E., Irzykowski W., Lehmann P. (2007): Genetic and molecular variability of a Turnip mosaic virus population from horseradish (*Cochlearia armoracia* L.). *J Appl Genet*, 48(3): 295-306.
- Li M., Lin Q., Chen Y., Xu F., Peng J., Zheng H., Wu G., Rao S., Chen J., Lu Y., Yan F. (2022): First Report of Turnip Mosaic Virus in Peanut (*Arachis hypogaea*) in China. *Plant Dis*. 106(3): 1077.
- Liu, X., Lu, W., Liu, Y., Li, J. (1990): A study of TuMV differentiation on cruciferous vegetables from ten provinces in China: a new host differentiator screening and strain classification. *Chin. Sci. Bull*, 35: 1734-1739.
- Liu X. P., Lu W. C., Liu Y. K., Wei S. Q., Xu J. B., Liu Z. R., Zhang H. J., Li J. L., Ke G. L., Yao W. Y., Cai Y. S., Wu F. Y., Cao S. C., Li Y. H., Xie S. D., Lin B. X., Zhang C. L. (1996): Occurrence and strain differentiation on turnip mosaic potyvirus and sources of resistance in Chinese cabbage in China. *Acta Horticulturae*, 407: 431-440.
- McClellan A.P.D., Cowin S.M. (1953): Diseases of crucifers and other plants caused by cabbage black ringspot virus. *Union of South Africa Department of Agriculture Science Bulletin*, 332: 1-30.

- Morero A., Fereres A. (2012): Viruses and Virus diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin. *Advances in Virus Research*. In: Loebenstein, G., Lecoq, H. (Eds.): *Advances in Virus Research, Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*, 247–288.
- Nguyen, H. D. et al. (2013): Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLOS One* 8.
- Nellist Ch. F., Ohshima K., Ponz F., Walsh J. A. (2021): Turnip mosaic virus, a virus for all seasons. *Annals of Applied Biology*: 1-16.
- Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., Hamamoto T., Tomimura K., Tan Z., Sano T., Azuhata F., Walsh J. A., Fletcher J., Chen J., Gera A., Gibbs A. (2002): Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen Virol (Pt 6)*: 1511-1521.
- Ohshima K., Tomitaka Y., Wood J. T., Minematsu Y., Kajiyama H., Tomimura K., Gibbs A. J. (2007): Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *J. Gen Virol.* 88 (Pt 1): 298-315.
- Palukaitis P., Kim S. (2021): Resistance of Turnip Mosaic Virus in the Family Brassicaceae. *Plant Pathol. J.* 37(1): 1-23.
- Pontis R.E. (1973): Turnip mosaic virus on annual stock in Argentina. *Plant Disease Reporter*, 57(4): 379-382.
- Revers, F., Garcia, J. A. (2015): Molecular biology of potyviruses. *Adv Virus Res* 92: 101-199.
- Sánchez, F., Wang, X., Jenner, C. E., Walsh, J. A., Ponz, F. (2003): Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Res.* 94: 33-43.
- Shattuck V. I. (1992): The biology, epidemiology and control of turnip mosaic virus. In: Janick J. (ed.): *Horticultural Reviews Volume 14*. New York, USA: John Wiley and Sons: 199-238.
- Stobbs, L. W., Shuttuck, V. I. (1989): Turnip mosaic virus strains in southern Ontario, Canada. *Plant Dis.* 73: 208-212.

- Sylvester, E. S. (1954): Aphid transmission of nonpersistent plant viruses with special reference to the Brassica nigra virus. *Hilgardia*, 23: 53–98.
- Špak J., Kubelková D. (1990): Occurrence of turnip mosaic virus in opium poppy (*Papaver somniferum*) in CSFR. *Ochrana Rostlin – UVTIZ (CSFR)* 26: 257–261.
- Tan Z., Gibbs A. J., Tomitaka Y., Sánchez F., Ponz F., Ohshima K. (2005): Mutations in Turnip mosaic virus genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *J Gen Virol.* 86(Pt 2): 501-510.
- Tompkins, C. M. (1939): Two mosaic diseases of annual stock. *Journal of Agricultural Research*, 58: 63–77.
- Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A., Ohshima, K. (2003): The phylogeny of Turnip mosaic virus: comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in east Asia. *Mol. Ecol.* 12: 2099-2111.
- Virus nekrotické mozaiky brukvovitých. [online] [navštíveno 21.5.2022] Dostupné z https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c420e96%22#rlp|so|choroby|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c420e96|popis
- Walsh J.A., Jenner C.E. (2002): Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular plant pathology*: 3(5): 289 –300.
- Zhu T., Li X., Yin X., Zhang C., Chen J., Tian Y., Liu J. (2017): The genetic structure of Turnip mosaic virus population reveals the rapid expansion of a new emergent lineage in China. *Virology* 514: 159–165.
- Zhu F., Sun Y., Wang Y., Pan H., Wang F., Zhang X., Zhang Y., Liu J. (2016): Molecular Characterization of the Complete Genome of Three Basal-BR Isolates of Turnip mosaic virus Infecting *Raphanus sativus* in China. *Int J Mol Sci.* Jun 4;17(6): 888.