

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Detekce a identifikace virů pomocí sekvenování nové
generace (NGS)**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Podrábská

Školitelka: Ing. Jana Fránová, Ph.D.

Školitel – specialista, konzultant: Mgr. Igor Koloniuk, Ph.D.

České Budějovice 2017

Podrábská, K., 2017: Detekce a identifikace virů pomocí sekvenování nové generace (NGS). [The detection and identification of viruses by next-generation sequencing (NGS). Mgr. Thesis, in Czech.] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Next generation sequencing is a modern method applied in plant virology for sensitive detection of previously characterized and novel pathogens without any preceding knowledge of them. In this study three novel and two already described viruses were detected by *de novo* assembly of Illumina single-end reads (Hi-Seq 2500 system) from total poly(A) enriched RNA of diseased red clover (*Trifolium pratense*) and indicator plant (*Nicotiana occidentalis* 37B). The complete genomic sequence of novel Red clover carlavirus A (RCCA) was determined from Illumina reads, 5', 3' RACE, cloning, RT-PCR and Sanger sequencing. The presence of RCCV was also confirmed in mechanically inoculated tobacco plant.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou 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 dne: 19. 4. 2017

.....

Bc. Kateřina Podrábská

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Ing. Janě Fránové, Ph.D. a školiteli – konzultantovi Mgr. Igorovi Koloniukovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, ochotu, milé jednání a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paní Janě Rakouské a Aleně Matyášové za cenné rady v laboratoři. Velké poděkování také patří mé rodině a příteli za jejich neskonalou podporu ve všech ohledech, starostlivost a lásku. Děkuji také všem přátelům, kteří mi byli oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíl práce.....	3
2. Literární přehled	4
2.1. Důležitost spolehlivých metod diagnostiky a detekce rostlinných virů v souvislosti s jejich ekologií, biologií, změnami podmínek a prevencí.....	4
2.2. Srovnání a rozvoj klasických i novějších detekčních a diagnostických metod rostlinné virologie se zaměřením na odhalení nových virů.....	5
2.3. Stručný vývoj sekvenačních metod vedoucí k rozvoji NGS a jejich základní charakteristiky.....	7
2.4. Využití metod NGS ve virologii.....	9
3. Materiál a metody	10
3.1. Materiál.....	10
3.2. Metody.....	10
3.2.1. Izolace celkové RNA.....	10
3.2.2. Analýza sekvenačních dat (NGS Illumina) pomocí CLC Genomic Workbench a Geneious.....	11
3.2.3. Reverzní transkripce.....	12
3.2.4. Navržení primerů.....	13
3.2.5. PCR a elektroforéza.....	15
3.2.6. 5' RACE.....	16
3.2.7. 3' RACE.....	19
3.2.8. Klonování a PCR kolonií.....	22
3.2.9. Příprava vzorků na sekvenování, sekvenování.....	25
4. Výsledky	27
4.1. Příznaky virového onemocnění zkoumaných rostlin.....	27
4.2. Analýza výstupních dat NGS zpracovaných v programu CLCGW programem Geneious a BLAST.....	27
4.3. Ověření sekvencí virů získaných z NGS v původních vzorcích jetele lučního a přenosu na tabák, dosyntetizování neúplných sekvencí virů a syntéza konců nového viru RCCA.....	28

4.3.1. Ověření sekvence viru RCCA v původních vzorcích pomocí RT-PCR, sekvenování a bioinformatické zpracování sekvencí v programu Geneious.....	28
4.3.2. Syntéza konců pomocí 5', 3' RACE, sekvenování, bioinformatické zpracování sekvencí viru RCCA v programu Geneious.....	28
4.3.3. Klonování 5', 3' konce, PCR kolonií, sekvenování, bioinformatické zpracování sekvencí viru RCCA v programu Geneious.....	29
4.3.4. Ověření sekvence nového viru z rodu <i>Nepovirus</i> v původních vzorcích pomocí RT-PCR, sekvenování a bioinformatické zpracování sekvencí v programu Geneious.....	31
4.3.5. Ověření sekvence nového viru z rodu <i>Amalgavirus</i> , dosyntetizování chybějícího sekvenčního úseku pomocí RT-PCR a sekvenování, bioinformatické zpracování sekvencí v programu Geneious.....	32
4.3.6. Ověření sekvence viru Soybean dwarf virus (<i>Luteovirus</i>), dosyntetizování chybějících sekvenčních úseků pomocí RT-PCR, sekvenování, bioinformatické zpracování sekvencí v programu Geneious.....	33
4.3.7. Ověření sekvence viru Bean yellow mosaic virus (<i>Potyvirus</i>) pomocí RT-PCR, sekvenování a bioinformatické zpracování sekvencí v programu Geneious.....	34
5. Diskuze.....	36
6. Závěr.....	41
7. Seznam použité literatury.....	42
8. Příloha.....	50

1. Úvod

Viry jsou obligátní vnitrobuněční parazité, nebuněčné organismy, neschopné samostatného metabolismu a rozmnožování, podle definice života neživé. Přesto se jako živé organismy chovají, obsahují geny, které mutují a jako organismy podléhají evoluci (Hull, 2009). První virus byl objeven na konci 19. století třemi zakladateli rostlinné virologie (Adolf E. Mayers, Dimitrii Ivanovsky, Martinus W. Beijerinck), kteří pracovali s virem mozaiky tabáku. Viry jsou pravděpodobně nejčtetnějšími organismy v biosféře infikující rozsáhlý okruh hostitelů, kterými jsou řasy, houby, bakterie, rostliny, živočichové i samotné viry (Flint *et al.*, 2015; Oldstone, 2010). Přestože je na ně vzhledem k parazitismu pohlíženo negativně, jsou významnou součástí ekosystémů, unikátním nástrojem molekulární biologie a některé mohou svým hostitelům dokonce přinášet výhody (Flint *et al.*, 2015). Příkladem využití v molekulární biologii je například použití silného 35S promotoru viru mozaiky kvěťáku v rostlinné transgenozí (Sander *et al.*, 1987). Pozitivní vliv v pěstitelství okrasných rostlin měly například rostlinné viry z rodu *Potyvirus* způsobující pestrokvětost tulipánů velmi ceněných v Nizozemsku v 16. a 17. století (Derks *et al.*, 1982; Van Slogteren & De Bruyn Ouboter, 1941). Tyto organismy na hranici živého a neživého jsou klasifikovány podle druhového konceptu skupinou International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) do rodů, podčeledí, čeledí a řádů, vyšší taxonomické jednotky se u virů neuvádějí. V současné době podle této taxonomie existuje 4404 druhů virů rozdělených do 735 rodů, 35 podčeledí, 122 čeledí a 8 řádů (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases). Jedná se pouze o zlomek diverzity, jelikož počet virů na Zemi odhadován na 10^{31} (Braibart & Rohwer, 2005).

Rostlinné viry jsou významnými patogeny především v zemědělství, jelikož redukují výnosy zemědělských plodin a jsou příčinou velkých ekonomických ztrát v této oblasti. Nabývají tvarů tyčinkovitých, vláknitých a isometrických, dále také tvarů baciliformních a dvou spojených isometrických částic (Bos, 1999; Gergerich & Dolja, 2006). Jsou složeny ze dvou základních komponentů, nukleové kyseliny a proteinového obalu, některé navíc obsahují vnější obal tvořený lipidy a proteiny (Gergerich & Dolja, 2006). Zatímco většina organismů je nositelem dsDNA, pouze malá část rostlinných virů vlastní tento genom. Nejpočetnější skupinou virů jsou RNA viry (76% ssRNA⁺, 13% ssRNA⁻, 4,3% dsRNA), menšinu tvoří DNA viry (4,1% ssDNA, 2% dsDNA) (Zaitlin & Hull, 1987). Genom všech virů kóduje přinejmenším tři typy proteinů: strukturní proteiny (structural proteins), kódující plášťové proteiny a další komponenty virionu; replikační proteiny (replication proteins),

kódující polymerázy a protézy a pohybové proteiny (movement proteins), zajišťující šíření viru mezi sousedními buňkami (Gergerich & Dolja, 2006). Rostlinné viry jsou přenosné mechanickou inokulací, roubováním, kokotící, pohybem rostlinného vegetativního množitelského materiálu, pylem, semeny, hmyzem (mery, mšice, třásněnky, křísi, červci, brouci), roztoči a přímým mechanickým přenosem z rostliny na rostlinu (Bos, 1999). Symptomy na hostitelských rostlinách se projevují v podobě primárních a sekundárních příznaků. Primární symptomy se projevují v místě vstupu virových částic do hostitelské rostliny a zahrnují vadnutí, nekrózy či chlorózy pletiv (lokální léze). Touto reakcí, především nekrotizací pletiv, se rostlina snaží zabránit rozšíření infekce do ostatních částí rostlin. Sekundární, systemická infekce se projevuje rozšířením viru do celé rostliny. K tomuto ději může dojít i velmi rychle přes vodivá pletiva rostliny. Mezi sekundární příznaky patří například kroužkovitost, systémová mozaika, kadeřavost, různé deformace, morfózy, zakrslost, svinutka listů, nádorovitost, chlorózy a nekrózy pletiv, pestrokvětost, červenání listů a mnoho dalších (Bos, 1960). V roce 1999 byl počet rostlinných virů odhadován na 1000 druhů, což je pouze zlomek dosud neodhalené diverzity. Lze ji obtížně odhadovat z mnoha důvodů: například mohou být obtížně detekovatelné v mnoha planých rostlinách a zemědělských plodinách, některé symptomy infikovaných rostlin mohou být zaměňované s fyziologickými problémy či genetickými odchylkami, infekce mohou být latentní. Jelikož je většina rostlinných virů vysoce infekčních, velmi často může v uniformním zemědělství docházet i k rozsáhlým epidemiím (Bos, 1999). Rostlinné viry mohou mít velmi úzký okruh hostitelů, např. virus tristézy citrusu, původce rozsáhlých epidemií na citrusech s devastačními následky v citrusovém průmyslu, infikuje pouze některé druhy uvnitř dvou rodů čeledi *Rutaceae* (Moreno *et al.*, 2008). Naopak nejširší hostitelský okruh celkově mezi viry má virus mozaiky okurky, který infikuje více než 1000 rostlinných druhů jednoděložných i dvouděložných, od bylin po keře a stromy (Edwardson & Christie, 1991) a je rozšířený po celém světě (Roossinck, 2002). K virovým onemocněním způsobujícím enormní agronomické a ekonomické ztráty patří šarka evropských švestek a meruněk redukcující jejich kvalitu a způsobující předčasný opad plodů (Cambra *et al.*, 2006).

Jetel luční (*Trifolium pratense*) patří mezi významné zemědělské plodiny ve Francii, Německu, Itálii a Rakousku. Dále se také pěstuje v jižní Africe, Chile, Novém Zélandu, Austrálii, Kanadě a USA (Rosso & Pagano, 2005). Tato plodina pocházející z jihovýchodní Evropy a Malé Asie zaujímá ve světě přibližně 20 milionů hektarů zemědělské půdy jako čistý porost i v kombinaci s travami (Smith *et al.* 1985; Taylor & Quesenberry, 1996). Jedná

se o hojně pěstovanou pícninu pro vysoký obsah nutričních látek. Je také významným činitelem při zúrodnování půdy vzhledem ke schopnosti vázat atmosferický dusík v kořenových hlízkách pomocí bakterie rodu *Rhizobium* a převádět ho do organismům přístupné formy. Velmi dobře zkypruje zemědělskou půdu rozsáhlým kořenovým systémem. Jedná se o plodinu odolnou, schopnou přetrvávat v odlišných prostředích, např. při různém pH, typu půdy či klimatických podmínkách, schopnou výrazné kompetice s pleveľy a chránící zemědělskou půdu před erozí (Clark, 2007; Rosso & Pegano, 2005; Zahran, 1999). Je schopný snášet i nízké pH a růst na méně úrodných či špatně odvodněných půdách (Fergus & Hollowell 1960; Smith *et al.* 1985; Taylor *et al.* 1997; Undersander *et al.* 1990). Virové patogeny snižují celkově výnosy pícnin, jejich fixaci dusíku, možnost kompetice s pleveľy a také zvyšují obsah estrogeních látek v infikovaných rostlinách (Barbetti *et al.* 1996; Jones 1991; Jones & Nicholas 1992; Jones & Ferris 2001).

1.1. Cíl práce

Tato práce je zaměřena na bioinformatickou analýzu sekvenačních dat získaných metodou sekvenování nové generace (NGS) Illumina (Hi-Seq 2500) ze vzorků izolované celkové poly(A) obohacené RNA z jetele lučního a z rostliny tabáku (*Nicotiana occidentalis* 37B) inokulované homogenátem z listů jetele lučního. Zajímala nás přítomnost nových virů uvnitř těchto rostlin vykazujících příznaky virových onemocnění. Zároveň byla práce zaměřena na získání sekvence celého genomu jednoho z nově objevených virů nazvaného Red clover carlavirus A. provedením 5', 3' RACE, sekvenováním, klonováním, RT-PCR a bioinformatickou analýzou.

2. Literární přehled

2.1. Důležitost spolehlivých metod diagnostiky a detekce rostlinných virů v souvislosti s jejich ekologií, biologií, změnami podmínek a prevencí

Detekce a diagnostika rostlinných virů je důležitým, stále se vyvíjejícím oborem rostlinné virologie (Boonham *et al.* 2007). Viry mají potenciál objevovat se kdekoli za vhodných podmínek. Rostlinné viry mají široký i užší okruh rostlinných hostitelů, biologických vektorů a jsou schopné přežít v odlišných ekosystémech, kterými jsou země, voda, vzduch, součástí vektorů i samostatně (stabilní viry). Dokáží se pasivně rozšířit i na velké vzdálenosti například uvnitř hmyzích vektorů, semen unášenými vodními, větrnými proudy, zvěří i samostatně. Jsou závislé na komplexní ekologii svých hostitelů zahrnující velké množství interakcí s živými i neživými složkami životního prostředí. Jejich evoluce je velmi rychlá a souvisí s jejich variabilitou, především u RNA virů (Bos, 1999). Vznikají u nich tzv. quasispecies, populace RNA virů s četnými mutantními formami, které vznikají činností k chybám náchylné RNA dependentní RNA polymerázy (Prabha *et al.*, 2013). K variabilitě výrazně přispívá také proces rekombinace a pseudorekombinace, který probíhá mezi viry vzájemně nebo viry a hostitelským genomem (Bos, 1999). Na variabilitě mají dále podíl heteroenkapsidace a vyšší replikační rychlost virů (Bos, 1999; Zukurov *et al.*, 2016). Tato variabilita uvnitř virové populace v souvislosti s působením selekčního tlaku a genetického driftu způsobuje vznik nových druhů (Escriu, 2017). Zvýšený výskyt a rozšíření rostlinných virů z původních míst výskytu nastalo s globalizovaným uvolněným obchodem a dopravou, pohybem množitelského materiálu na dlouhé vzdálenosti, obzvláště okrasných květin, a také změnami klimatických podmínek (Boonham *et al.*, 2007). Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím výskyt a rozšíření virů jsou lidské zásahy v zemědělství (Bos, 1999). Všechny tyto změny narušují nastolenou dávnou rovnováhu vzniklou koevolucí mezi rostlinným hostitelem a patogenem (Damsteegt, 1999). Složité ekologické interakce, rychlost evoluce, téměř všudypřítomnost, možnost přenosu na velké vzdálenosti a lidské zásahy činí z virů nebezpečné patogeny pro zemědělce a pěstitele po celém světě. Jelikož k nemocem způsobeným rostlinnými viry neexistuje vhodná léčba, prevence je jedinou ochranou před těmito patogeny. K preventivním opatřením je nezbytná přesná diagnostika virů založená na spolehlivé detekci spojená s hlubokou znalostí ekologie virů, především hostitelské a vektorové specificity (Bos, 1999).

2.2. Srovnání a rozvoj klasických i novějších detekčních a diagnostických metod rostlinné virologie se zaměřením na odhalení nových virů

Vzhledem k výše zmíněným faktům se zvyšuje potřeba zavádět nové, rychlejší, levnější a citlivější metody ke kontrole semen, jiného množitelského materiálu a polních vzorků, tedy k fyto-sanitárním, ale také k výzkumným účelům. Mezi klasické detekční a diagnostické metody patří hodnocení příznaků testovaných rostlin, biologické testy, elektronová mikroskopie, serologické testy a molekulární metody založené na stanovení nukleové kyseliny (např: PCR, real-time PCR, RT-PCR, hybridizace nukleových kyselin) (Boonham *et al.*, 2008). Nejstaršími metodami jsou biologické testy a elektronová mikroskopie (Prabha, 2013). Mezi biologické testy patří mechanický přenos (inokulace homogenátu na hostitelskou rostlinu), přenos roubováním, hmyzími vektory či vyjímečně kokotící (Bos, 1999). Již v roce 1929 F.O. Holmes zjistil, že některé druhy tabáku vykazují lokální nekrotické léze po inokulaci virem mozaiky tabáku a množství těchto příznaků u *Nicotiana glutinosa* bylo použito ke stanovení koncentrace virové suspenze (Holmes, 1929). Nevýhodou mechanické inokulace na hostitelskou rostlinu je její závislost na dostupnosti vhodné, kvalitní indikátorové rostliny, časová náročnost, subjektivita a vyšší náklady, které souvisí se zajištěním speciálních podmínek. V některých případech může dojít k projevu příznaků na hostitelské rostlině až za několik měsíců (Boonham & Glover, 2008). Metoda také není univerzální, jelikož ne všechny viry lze bez problému mechanicky přenést (Adam *et al.*, 2009). Pomocí elektronové mikroskopie je možné určovat morfologii, velikost virů, zjišťovat smíšené infekce v rostlinném homogenátu a určovat lokalizaci virů uvnitř tkání, buněk a organel ultratenkými řezy. Jedná se o finančně náročnou metodu (Bos, 1999). Citlivost metody je omezená tím, že ne všechny virové částice lze jednoduše vizualizovat pomocí elektronové mikroskopie (Adam *et al.*, 2009). Specifita a senzitivita této metody může být zvýšena kombinací se serologickými metodami nebo značením virových částic koloidním zlatem (Bos, 1999). Inokulace na indikátorovou rostlinu a elektronová mikroskopie jsou nespecifické metody schopné jen v některých případech určit viry do rodů a čeledí, ke konečné identifikaci je potřeba dalších metod (Adams *et al.*, 2009). K průlomům v diagnostice a detekci rostlinných virů došlo zavedením serologického ELISA testu využívajícím polyklonálních a později monoklonálních protilátek (Clark & Adams, 1977) a PCR (Candresse *et al.*, 1998). ELISA, vyvinutá kolem roku 1950, se stala rutinně používanou a robustní metodou a je dodnes používána v téměř všech diagnostických laboratořích po celém světě zabývajících se detekcí rostlinných, živočišných a lidských patogenů.

Molekulární metody byly zpočátku přijímány obvykle v případech, kdy ELISA nebyla vhodná např. kvůli nedostupnosti vhodných protilátek, nedostatečné specifitě či sensitivitě. Postupem času v souvislosti s rozvojem molekulárních metod byly tyto metody lépe přijímané a v některých případech nahradily tradiční metodu ELISA (Boonham & Glover, 2008). Mezi takové pokroky v molekulárních metodách patřily rozvoj extrakčních metody nukleových kyselin, spolehlivé vnitřní kontroly, zvýšená přístrojová automatizace, standardizace formátu a také možnost detekovat více virů v jediném testu (multiplexing) (Mumford *et al.*, 2006). Tyto změny zasáhly například metodu real-time PCR, která v některých případech nahradila rutinně používanou metodu ELISA (Boonham & Glover, 2008). Rozvoj multiplexních metod přinesl výhody v podobě nižších nákladů a časové úspory v souvislosti s potřebou zpracování většího množství vzorků. Z těchto metod mají ve virologii potenciál například metoda MIA (the universal bead microsphere immuno assay), Luminex MAGplex-TAG bead system a mikročipy (Boonham *et al.*, 2014).

Vývoj v detekčních a diagnostických metodách schopných detekovat nové rostlinné viry byl pomalejší (Boonham & Glover, 2008). Charakterizace nových virů před zavedením metod NGS závisela na širokém spektru výše zmíněných tradičních či moderních metod. Proces identifikace většinou začíná hledáním podezřelých známých virů metodami serologickými (ELISA) nebo molekulárními (PCR, dot-blot hybridizace). V případě negativních výsledků je následně využito metod elektronové mikroskopie, inokulace na indikátorovou rostlinu a PCR s degenerovanými primery (Gibbs & Mackenzie, 1997) či mikročipy. K identifikaci virů je také potřeba dobré znalosti hostitelského okruhu virů. Proces identifikace a diagnostiky nového rostlinného viru může být tedy velmi dlouhodobý (Adam *et al.*, 2009). Například odhalení původce onemocnění zvratu černého rybízu (BRV, rod *Nepovirus*, čeleď *Comoviridae*) trvalo mnoho let za použití tradičních virologických a molekulárních metod (Susi, 2004). PCR je metodou rychlou, velmi sensitivní a specifickou, což je výhodné pro určování virů s přesně známou sekvencí a nevýhodné pro detekci nových virů (McLoughlin, 2011). Použitím PCR se skupinově specifickými primery je možné zjistit pouze část z přítomných již známých nebo nových virů uvnitř zacílené skupiny. Další nevýhodou použití degenerovaných primerů v PCR je možný vznik falešně pozitivních výsledků nespecifickou amplifikací hostitelské nukleové kyseliny. Použitím směsi polyklonálních protilátek v ELISA testu je možné stanovit příbuzné varianty či odlišné druhy virů, avšak další charakterizace je obtížná (Prabha *et al.*, 2013). Mikročipy, metoda méně citlivá, specifická a časově náročnější než PCR je vhodnější k objevování

nových virů než výše zmíněné metody s použitím prób komplementárních ke konzervované virové oblasti (McLoughlin, 2011). Všechny tyto metody tedy závisí na předešlé znalosti sekvence nebo protilátek a nejsou nejvhodnější k identifikaci nových virů nebo virů infikujících nového hostitele (Prabha *et al.*, 2013). Vzhledem k výše zmíněným nedostatkům poskytují rychle se rozvíjející metody sekvenování nové generace (NGS) přímou detekci a charakterizaci nových nebo již známých rostlinných virů (Barba *et al.*, 2014; Prabha *et al.*, 2013). Vzhledem k vysoké citlivosti mají potenciál odhalit celé spektrum virů uvnitř vzorku (Barzon *et al.*, 2014). Běžné metody vzhledem k nižší citlivosti mohou také selhat v identifikaci viru, např. réva vinná vykazující symptomy podobné virovým onemocněním byla testována metodami ELISA, RT-PCR se specifickými i degenerovanými primery a pozorována v elektronovém mikroskopu s negativními výsledky. Teprve masivní sekvenování malých molekul RNA metodou Illumina prokázala přítomnost nového viru a již identifikovaných virů a viroidů (Giampetruzzi *et al.*, 2012). Zda-li se neustále se vyvíjející metody NGS stanou v budoucnu rutinními a nahradí současné diagnostické a detekční metody ve virologických laboratořích, případně které jimi budou, není jasné, mají však velký potenciál a na dalším vývoji závisí mnoho faktorů. Jedním z nich je cena vzorku na jeden sekvenační běh NGS a cena platform, které se budou pravděpodobně snižovat v souvislosti s technologickým vývojem metod, který je poháněn rozvojem personalizované medicíny ve zdravotnictví s cílem sekvenovat celé lidské genomy za nízké náklady. Prozatím jsou přístroje vzhledem k cenové nepřístupnosti centralizované do specializovaných pracovišť, které také umožňují následnou analýzu dat (Boonham & Glover, 2008; Boonham *et al.*, 2014).

2.3. Stručný vývoj sekvenačních metod vedoucí k rozvoji NGS a jejich základní charakteristiky

V roce 1977 vyvinuli Fred Sanger a Alan R. Coulson metodu sekvenování (Sanger, 1977 *et al.*¹; Sanger *et al.*, 1977²), dnes nazývanou Sangerovo metodou, která celkově transformovala biologii možností dešifrování kompletních genů a později celých genomů (Schuster, 2007). Tato metoda byla vylepšením již starších technik, Sangerovo 'plus minus' metody (Sanger & Coulson, 1975) a Maxam - Gilbertovo techniky (Maxam & Gilbert, 1977). Skrze výhody v podobě redukováných chemikálií a radioizotopů se stala Sangerova metoda na dalších 30 let jedinou používanou DNA sekvenační technikou (Schuster, 2007). Postupem času spolu s rozvinutějšími sekvenátory, programy a bioinformatikou se zvyšovala automatizace, výkonnost, přesnost a paralelizace sekvenačních

přístrojů (Tucker *et al.*, 2009). Snahy osekvenovat lidský genom vedly k vyvinutí přístrojů automatizované kapilární gelové elektroforézy, jež jsou dnes soustředěné do centralizovaných sekvenačních pracovišť (Schuster, 2007). Tento vývoj umožnil využít Sangerovo sekvenování nejen k sekvenačním projektům menšího měřítka (v jednotkách kilobází), ale také k projektům s cílem osekvenovat genomy v jednotkách megabází (Tucker *et al.*, 2009). I přes dva úspěšně dokončené projekty zacílené na osekvenování celého lidského genomu neskončily snahy o zlepšování výkonnosti a snižování ceny sekvenování (Schuster, 2007). Tyto snahy vyústily na počátku 21. století, kdy se staly dostupnými metody sekvenování nové generace dnes založené na vysoce efektivních a výkonných platformách umožňujících rychlé, citlivé a dnes již poměrně levné stanovení nukleových kyselin překonávající možnosti tradičního Sangerovo sekvenování (Barba *et al.*, 2014; Tucker *et al.*, 2009). Tyto výhody spočívají především ve schopnosti metod NGS generovat paralelně miliony čtení (kapilární sekvenátor: 96 čtení daných počtem kapilár) na jeden běh sekvenátoru. Další výhodou NGS je vynechání amplifikačního klonovacího kroku před Sangerovo sekvenováním (Mardis, 2008). Současné metody NGS závisí na třech základních krocích: příprava knihoven, oddělení, obohacení molekul DNA a sekvenování/detekce (Adam *et al.*, 2009). DNA fragmenty pro NGS jsou připraveny z knihoven ligací specifických adaptérů na oba konce DNA komplementárních k oligonukleotidům přichycených na amplifikační povrch platform (kromě SMRT a Oxford Nanopore) (Mardis, 2008, Tucker *et al.*, 2009). Každý fragment vytvořené knihovny je amplifikován a sekvenován nezávisle na jiném fragmentu knihovny. Pokud je zvoleno masivní sekvenování, potom i ojedinělé mutantní formy mohou být identifikovány (Tucker *et al.*, 2009). Nevýhodou sekvenování nové generace je produkce kratších čtení (~35-800 pb, v závislosti na platformě) na rozdíl od kapilárních sekvenátorů (do ~ 1000 pb) (Luo *et al.*, 2012; Tucker *et al.*, 2009). Kratší délka čtení oproti Sangerovo sekvenování může způsobit problémy v *de-novo* skládání genomu, především v repetitivních oblastech a reorganizovaných oblastech genomu. Nevýhodou extrémního množství výstupních dat je potřebná bioinformatická expertýza a počítače vhodné pro analýzu takového objemu dat (Tucker *et al.*, 2009). První vyvinutou vysokokapacitní technologií nové generace byla NGS 454 FLX pyrosekvenační platforma od společnosti 454 Life Sciences dostupná od roku 2005 a převzatá firmou Roche. V roce 2007 byl představen Genom Analyzer společností Illumina (dříve Solexa GA), v roce 2006 platforma SOLid (Applied Biosystems). Později byly vyvinuté další nové a vylepšené platformy jako Ion Torrent PGM (Life Technologies), Real-Time sekvenační platforma (Pacific Biosciences) a Heliscope (Helicos)(Barzon *et al.*, 2011).

Single Molecule Real-Time sekvenační platforma, Oxford Nanopore a další nové metody založené na sekvenování jediné dlouhé molekuly DNA jsou nazývány metodami třetí generace (Schadt *et al.*, 2010). Sekvence jsou čtené při syntéze nového řetězce přidáváním jednotlivých nukleotidů DNA polymerázou (sequencing by synthesis – 454 pyrosekvenování, Illumina, Ion Torrent a Heliscope, SMRT) či ligací oligonukleotidů (sequencing by ligation - SOLid) (Ansorge, 2009; Barzon *et al.*, 2011).

2.4. Využití metod NGS ve virologii

Od roku 2004 byly metody NGS aplikovány na biologickém poli, zatímco v rostlinné virologii byly zavedeny až v roce 2009 (Barba *et al.*, 2014). Všeobecně se ve virologii využívají například k metagenomickým studiím, celogenomovému sekvenování, RNA sekvenování a objevování malých RNA (Zukurov *et al.*, 2016). Tyto metody jsou významné v odhalování mikrobiální evoluce, fylogeografie, mechanismu patogeneze, ekologie, epidemiologie virů, interakce virů s hostitelským organismem, mechanismu úniku před imunitní odpovědí rostliny, populační dynamiky a virové virulence (Barba *et al.*, 2014 ; Prabha *et al.*, 2013; Studholme *et al.*, 2011). Metody NGS a jejich platformy lišící se biochemií, celkově principem sekvenování, výkonností, chybovostí, cenou a délkou readů, se hodí k různým účelům a aplikacím. Například SOLid systém může být vhodnější vzhledem k množství výstupních dat na jeden sekvenační běh a kratší délce čtení k RNA sekvenačním projektům a celogenomovým resekvenačním projektům. Sekvenování 454 a Illumina jsou vhodné k *de-novo* skládání genomu a relativně dlouhá délka 454 FLX čtení k hlubokému sekvenování amplikonů s využitím v analýze tzv. quasispecies a mikrobiální a virové metagenomice (Barzon *et al.*, 2011; Tucker *et al.*, 2009). Jedna z metagenomických analýz byla provedena a vyvinuta na modelovém systému Pepino mosaic virus - rajče z izolované totální RNA sekvenované pomocí GS FLX Genome Sequencer - Roche (Adams *et al.*, 2009). Další metagenomická analýza byla provedena ze vzorku révy vinné z izolované dsRNA pomocí Illumina Genome Analyzer II (Coetzee *et al.*, 2010). Jiným příkladem je masivní sekvenování siRNA symptomatické i asymptomatické rostliny povíjnice batátové metodou Illumina (Kreuze *et al.*, 2009). Další možností je zkoumání virové diversity virů uvnitř vektorů (Ng *et al.*, 2011).

3. Materiál a metody

Následující pasáž o rozsahu sedmnácti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

4. Výsledky

Následující pasáž o rozsahu devíti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

5. Diskuze

Následující pasáž o rozsahu pěti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

6. Závěr

Následující pasáž o rozsahu jedné strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

7. Seznam literatury

- Abraham, A. D., Menzel, W., Vetten, H. J. & Saucke, H. (2007). First Report of Soybean dwarf virus (GenusLuteovirus) Infecting Faba Bean and Clover in Germany. *Plant Disease*, 91(8), 1059-1059.
- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. & Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 537-545.
- Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25(4), 195-203.
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses*, 6(1), 106-136.
- Barbetti, M.J., Jones, R.A.C. & Riley, I.T. (1996). Problems and progress in assessing direct and indirect yield losses caused by pathogens in pasture species. In: Chackraborty, K.T., Leath, R.A., Skipp, G.A., Pederson, R.A., Bray, G.C.M. & Latch, F.W., Nutter (ed.): Pasture and Forage Crop Pathology. Pasture and Forage Crop Pathology. American Society of Agronomy: Madison, p. 63–91.
- Barnet, O.W. & Diachun S. (1985). Virus diseases of clovers. In: Taylor N.L. (ed.): Clover Science and Technology. American Society of Agronomy, Inc., Madison, p. 235–268.
- Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., & Palù, G. (2011). Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 7861-7884.
- Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., & Palù, G. (2014). Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology. *Omics in Clinical Practice*, 351-380.
- Boonham, N., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2007). Microarrays for Rapid Identification of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 307-328.
- Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2008). Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 355-363.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., Van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20-31.
- Bos, L. (1960). Symptoms of virus diseases in plants. Centre for Agricultural Publications and Documentation, Wageningen.

Bos, L., Maat, D. Z., & Markov, M. (1972). A biologically highly deviating strain of red clover vein mosaic virus, usually latent in pea (*Pisum sativum*), and its differentiation from pea streak virus. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78,125-152.

Bos, L. (1999). *Plant Viruses, Unique and Intriguing Pathogens: A Textbook of Plant Virology*. Backhuys Publisher, Leiden.

Breitbart, M., & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13(6), 278-284.

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. & Zurcher, E.J. (eds.) (1996). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 16th January 1997 <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>.

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., & Llácer, G. (2006). Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36(2), 202-204.

Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorriss, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia D. & QuiotDunez, J. (1998). Comparison of Monoclonal Antibodies and Polymerase Chain Reaction Assays for the Typing of Isolates Belonging to the D and M Serotypes of Plum Pox Potyvirus. *Phytopathology*, 88(3), 198-204.

Candresse, T., Marais, A. & Faure, C. (2013). First report of *Southern tomato virus* on tomatoes in southwest France. *Plant Disease* 97,1124.

Candresse, T., Marais, A., Sorrentino, R., Faure, C., Theil, S., Cadot, V., Rolland, M., Villemot, J. & Rabenstein, F. (2015). Complete genomic sequence of barley (*Hordeum vulgare*) endornavirus (HvEV) determined by next-generation sequencing. *Archives of Virology*, 161(3), 741-743.

Clark, A. (2007). *Managing cover crops profitably* (3rd ed.). The Sustainable Agriculture Research and Education (SARE) program, Maryland.

Coetzee, B., Freeborough, M., Maree, H. J., Celton, J., Rees, D. J., & Burger, J. T. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400(2), 157-163.

Damsteegt, V.D., Hewings, A.D. & Sindermann, A.B. (1990). Soybean dwarf virus: experimental host range, soybean germ plasm reactions, and assessment of potential threat to U.S. soybean production. *Plant Disease* 74,992–995.

Damsteegt, V. (1999). *New and Emerging Plant Viruses. APSnet Feature Articles*.

Damsteegt, V.D., Stone, A.L., Russo, A.J., Luster, D.G., Gildow, F.E. & Smith, O.P. (1999). Identification, characterization, and relatedness of luteovirus isolates from forage legumes. *Phytopathology* 89,374–379.

- Derks, F. L. M., Vink-Vanden Abeele, J. L. & Van Schadewijk, A. R. (1982). Purification of tulip breaking virus and production of antisera for use in ELISA. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88, 87-98.
- Edwardson, J. R. & Christie, R. G., 1991: Cucumoviruses. In: Handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Boca Raton, 293–319.
- Escriu, F. (2017). Diversity of Plant Virus Populations. In: Bitz, L. (ed.): A Valuable Tool for Epidemiological Studies, Genetic Diversity. InTech.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger U. & L.A. Ball (2005). Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses : 8. report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam.
- Fergus E.N. & Hollowell E.A. (1960). Red clover. *Advances in Agronomy* 12, 365-436.
- Fletcher, J., Tang, J., Blouin, A., Ward, L., MacDiarmid, R., & Ziebell, H. (2016). Red clover vein mosaic virus—A Novel Virus to New Zealand that is Widespread in Legumes. *Plant Disease*, 100(5), 890-895.
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M., & Enquist, L. W. (2015). *Principles of virology*. Washington: ASM Press.
- Fránová, J., Paltrinieri, S., Botti, S., Šimková, M., & Bertaccini, A. (2004). Association of phytoplasmas and viruses with malformed clovers. *Folia Microbiologica*, 49(5), 617-624.
- Fránová, J., Petrzik K., Jakešová H., Bečková M. & Sarkisova T (2009). Cultivated and wild growing forage crops – reservoirs of viruses and phytoplasmas. In: Nedělník, J., Macháč, R. & Cagaš, B.(ed.): Alternative Functions of Grassland. Research Institute for Fodder Crops Ltd., Grassland Federation Symposium, Brno, 106 – 108.
- Fránová, J., & Jakešová, H. (2012). First Report of Bacilliform Badnavirus-like Virus Particles in Red Clover. *Journal of Phytopathology*, 160(10), 588-590.
- Fránová, J. & Jakešová, H. (2014). Susceptibility of Ten Red Clover (*Trifolium pratense*) Cultivars to Six Viruses after Artificial Inoculation. *Plant Protection Science* 50(3), 113-118.
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R. & Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163(1), 262-268.
- Gibbs, A. & Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 63, 9–16.

- Graves, C. H., & Hagedorn, D. J. (1956). The red clover vein-mosaic virus in Wisconsin. *Phytopathology* 46, 257-260.
- Hagedorn, D. J., Bos, L. & Van der Want, J. P. H. (1959). The red clover veinmosaic virus in the Netherlands. *Tijdschrift over plantenziekten* 65,13-23.
- Harrison, B., Steinlage T.A., Domier, L.L. & D'Arcy, C.J. (2005). Incidence of Soybean dwarf virus and identification of potential vectors in Illinois. *Plant Disease* 89: 28–32.
- Holmes, F. O. (1929). Local Lesions in Tobacco Mosaic. *Botanical Gazette*, 87(1), 39-55.
- Hull, R (2009). *Comparative Plant Virology*. Elsevier, Amsterdam.
- Igori, D., Lim, S., Zhao, F., Baek, D., Park J.M., Cho, H.S, Kim, H.S., Kwon & S.Moon, J.S. (2016). The complete sequence and genome organization of ligustrum virus A, a novel carlavirus. *Archives of virology* 161:3593–3596.
- Jones, R.A.C. (1991.) Losses in productivity of subterranean clover swards caused by sowing cucumber mosaic virus-infected seed. *Annals of Applied Biology* 119, 273–288.
- Jones, R.A.C. & Nicholas, D.A. (1992). Studies on alfalfa mosaic virus infection of burr medic (*Medicago polymorpha*) swards: seed-borne infection, persistence, spread and effects on productivity. *Australian Journal of Agricultural Research* 43, 697–715.
- Jones, R.A.C. & Ferris, D.J. (2001). Virus infection stimulates phyto-oestrogen production in pasture legume plants growing in grazed swards. *Annals of Applied Biology* 138, 171–179.
- Jonczyk, M., Le Gall, O., Palucha, A., Borodynko, N., & Pospieszny, H. (2004). Cloning and sequencing of full-length cDNAs of RNA1 and RNA2 of a Tomato black ring virus isolate from Poland. *Archives of Virology*, 149(4), 799-807.
- Kaneshige, H., Maeda, T. & Inouye, N. (1991). Host range and properties of bean yellow mosaic virus infecting crocus and serological relationships among three strains of BYMV. *Nogaku Kennkyu* 62, 225–240.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., & Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1-7.
- Kutnjak, D., Silvestre, R., Cuellar, W., Perez, W., Müller, G., Ravnikar, M., & Kreuze, J. (2014). Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Research*, 191, 45-50.
- Larsen, R.C., Kaiser, W.J. & Wyatt, S.D. (1997). First report of a virus disease of chickpea caused by a strain of red clover mosaic carlavirus. *Plant Disease* 80, 709.

- Larsen, R.C. & Myers, J.R. (1998). First report of red clover vein mosaic carlavirus naturally infecting lentil. *Plant Disease* 82,1064.
- Larsen, R. C., Wyatt, S. D., & Druffel, K. L. (2009). The complete nucleotide sequence and genome organization of red clover vein mosaic virus (genus Carlavirus). *Archives of Virology*, 154(5), 891-894.
- Leke, W. N., Khatabi, B., Mignouna, D. B., Brown, J. K., & Fondong, V. N. (2016). Complete genome sequence of a new bipartite begomovirus infecting cotton in the Republic of Benin in West Africa. *Archives of Virology*, 161(8), 2329-2333.
- Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N., Read, T., & Konstantinidis, K. T. (2012). Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLoS ONE*, 7(2), e30087.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24(3), 133-141.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- McLoughlin, K. S. (2011). Microarrays for Pathogen Detection and Analysis. *Briefings in Functional Genomics*, 10(6), 342-353.
- Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M. R., Guerri, J., & Pena, L. (2008). Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., & Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), 1-19.
- Oldstone, M. B. (2010). *Viruses, plagues, and history: Past, present, and future*. Oxford University Press, New York.
- Osborn, H. T. (1937). Vein-mosaic virus of red clover. *Phytopathology* 27, 1051-1058.
- Padmanabhan, C., Zheng, Y., Li, R., Sun, S., Zhang, D., Liu, Y., Fey, Z. & Ling, K. (2015). Complete Genome Sequence of Southern tomato virus Identified in China Using Next-Generation Sequencing. *Genome Announcements*, 3(5), e01226-15.
- Prabha, K., Baranwal, V. K., & Jain, R. K. (2013). Applications of Next Generation High Throughput Sequencing Technologies in Characterization, Discovery and Molecular Interaction of Plant Viruses. *Indian Journal of Virology*, 24(2), 157-165.
- Roossinck, M. J. (2002). Evolutionary History of Cucumber Mosaic Virus Deduced by Phylogenetic Analyses. *Journal of Virology*, 76(7), 3382-3387.

- Rosso, B. S., & Pagano, E. M. (2005). Evaluation of Introduced and Naturalised Populations of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) at Pergamino EEA-INTA, Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(5), 507-511.
- Sanders, P., Winter, J., Barnason, A., Rogers, S., & Fraley, R. (1987). Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*, 15(4), 1543-1558.
- Sanger, F., & Coulson, A. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. (1977)¹. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687-695.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977)². DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sabanadzovic, S., Valverde, R. A., Brown, J. K., Martin, R. R., & Tzanetakis, I. E. (2009). Southern tomato virus: The link between the families Totiviridae and Partitiviridae. *Virus Research*, 140(1-2), 130-137.
- Selvaraj, G. D., Pokorny, R., & Holkova, L. (2009). Variability of Bean yellow mosaic virus isolates in the Czech Republic. *Acta Virologica*, 53(4), 277-280.
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 20(4), 853-853.
- Schuster, S. C. (2007). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5(1), 16-18.
- Smith, R.R., Taylor, N.L. & Bowley S.R. (1985). Clover Science and Technology. Agronomy Monograph 25. ASA, CSSA, SSSA, Madison.
- Studholme, D. J., Glover, R. H., & Boonham, N. (2011). Application of High-Throughput DNA Sequencing in Phytopathology. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 87-105.
- Susi, P. (2004). Black currant reversion virus, a mite-transmitted nepovirus. *Molecular Plant Pathology*, 5(3), 167-173.
- Tamada, T. (1975). Studies on the soybean dwarf disease. *Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations* 25, 1-144.
- Taylor, N.L. & Quesenberry, K.H. (1996). Red Clover Science. Series: Current Plant Sciences and Biology in Agriculture: 28. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Taylor, N.L., Henning, J.C. & Lacefield, G.D. (1997). Growing Red Clover in Kentucky. AGR-33, University of Kentucky-Extension, Lexington.

Terauchi, H., Kanematsu, S., Honda, K., Mikoshiba, Y., Ishiguro, K., & Hidaka, S. (2001). Comparison of complete nucleotide sequences of genomic RNAs of four Soybean dwarf virus strains that differ in their vector specificity and symptom production. *Archives of Virology*, 146(10), 1885-1898.

Ng, T. F., Duffy, S., Polston, J. E., Bixby, E., Vallad, G. E., & Breitbart, M. (2011). Exploring the Diversity of Plant DNA Viruses and Their Satellites Using Vector-Enabled Metagenomics on Whiteflies. *PLoS ONE*, 6(4), e19050.

Tsuchizaki, T., Goto, T., Fujisawa, I. & Yoshida, K. (1981). Virus disease occurring on legumes and vegetables in Hokkaido. *Research bulletin of the Agricultural Experiment Station 131*, 71–93.

Tucker, T., Marra, M., & Friedman, J. M. (2009). Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 142-154.

Undersander, D.J., Smith R.R., Kelling, K., Doll, J., Worf, G., Wedberg, J., Peters, J., Hoffman, P. & Shaver, R. (1990). In: Red Clover: Establishment, Management, and Utilization. A3492, University of Wisconsin-Extension. Madison.

Van Slogteren, E. & De Bruvn Ouborter, M.P. (1941). Onderzoekingen over virusziekten in bloembolgewassen. II. Tulpen I. Mededelingen van de Landbouwhoogeschool ,Wageningen.

Veetil, T., Hobbs, H. A., & Domier, L. L. (2009). Sequence diversity of readthrough proteins of Soybean dwarf virus isolates from the Midwestern United States. *Archives of Virology*, 154(5), 861-866.

Wada, Y., Iwai, H., Ogawa, Y. & Arai, K. (2000). Pathogenicity and serological properties of Bean yellow mosaic virus isolates from gladiolus. *Japanese Journal of Phytopathology* 66, 44–48.

Wetter, C., Quantz, L. & Brandes, J. (1959). Verwandtschaft zwischen dem Stauchevirus der Erbse und dem Rotkleadernmosaik-virus (red clover vein mosaic virus). *Phytopathologische Zeitschrift* 35, 201-204.

Wylie, S. J., & Jones, M. G. (2010). The complete genome sequence of a Passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology*, 156(3), 479-482.

Zahran, H.H (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (4), 968–989.

Zaitlin, M. & Hull, R. (1987). Plant Virus-Host Interactions. *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1), 291-315.

Zarzyńska-Nowak, A., Ferriol, I., Falk, B. W., Borodynko-Filas, N., & Hasiów-Jaroszewska, B. (2017). Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated tomato black ring virus infectious cDNA clones. *Virus Research*, 230, 59-62.

Zukurov, J. P., Do Nascimento-Brito, S., Volpini, A. C., Oliveira, G. C., Janini, L. M., & Antoneli, F. (2016). Estimation of genetic diversity in viral populations from next generation sequencing data with extremely deep coverage. *Algorithms for Molecular Biology* 11(1).

8. Příloha

Následující pasáž o rozsahu jedenácti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.