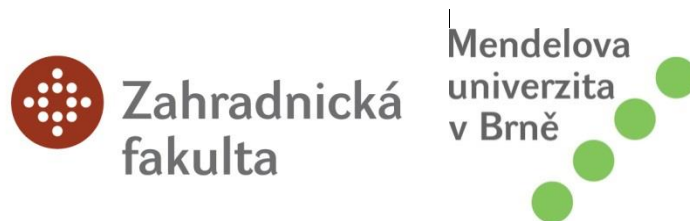


Mendelova univerzita v Brně  
Zahradnická fakulta



**Možnosti využití antivirotik v procesu eliminace virů u  
česneku kuchyňského**

Disertační práce

Vedoucí práce:  
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Vypracoval:  
Ing. Martina Kudělková

Lednice 2016

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat doc. Mgr. Miroslavu Baránkovi, Ph.D. jako vedoucímu své disertační práce, Ing. Evě Ondrušiková, CSc., Ing. Břetislavu Křížanovi, Ph.D. a celému kolektivu *in vitro* laboratoře za podporu, pomoc a zázemí, které mi po celou dobu v *in vitro* laboratoři poskytovali. Dále chci poděkovat Ing. Haně Saskové, Ing. Janě Čechové, Ph.D. a Ing. Aleši Eichmeierovi, Ph.D. za ochotu a čas, který se mnou strávili v laboratoři při detekci virových patogenů. Děkuji také Ing. Miroslavu Vachůnovi, Ph.D. za spolupráci při statistickém vyhodnocování výsledků této práce a v neposlední řadě všem kolegům z Mendeleum-ústavu genetiky a dalším lidem, kteří mi v průběhu práce pomáhali.

Velké poděkování patří mé nejbližší rodině a přátelům, kteří byli po celou dobu studia neocenitelnou podporou.

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci „Možnosti využití antivirotik v procesu eliminace virů u česneku kuchyňského“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:.....

.....

Podpis

## ABSTRAKT

Disertační práce „Možnosti využití antivirotik v procesu eliminace virů u česneku kuchyňského“ byla zaměřena na studium vlivu tří antivirotik, acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu, pro jejich možné použití v procesu chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou pro eradikaci virů *Onion yellow stripe virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Garlic common latent virus* a *Shallot latent virus* v podmínkách *in vitro*.

Antivirotika byla aplikována vždy jednotlivě do kultivačního média a sledovány byly dvě koncentrace (25 nebo 50 mg.l<sup>-1</sup>). Doba působení antivirotik byla dva týdny. Prostá meristémová kultura byla zvolena jako kontrolní metoda. Ve všech variantách bylo použito Murashige a Skoog medium.

První rok práce byly chemoterapií ošetřeny rostliny česneku odrůdy 'D'Alsace Freres' kultivované *in vitro*, které byly již jednou, neúspěšně, ošetřeny metodou meristémových kultur. Přítomnost virových patogenů byla detekována metodou ELISA. Jako nejefektivnější varianta pro eliminaci sledovaných virů byla varianta aplikace rimantadinu v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup>.

Pro další části experimentu byla pro detekci přítomnosti sledovaných virů optimalizována citlivější metoda reverzně-transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR), a to včetně návržení a ověření primerů pro detekci viru *Garlic common latent virus* (GCLV).

Druhý rok byly chemoterapií ošetřeny izolované meristémy s ponecháním jednoho listového primordia o velikosti 0,8 mm. Explantáty odrůd česneku 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' však neregenerovaly ani u kontrolní varianty a chemoterapie nemohla být hodnocena.

V dalších dvou letech byly chemoterapií ošetřeny jednotlivé stroužky česneku odrůdy 'Unikát'. U rostlin byla před ošetřením provedena detekce přítomnosti virových patogenů a pouze jedna rostlina byla všech sledovaných virů prostá. Při vyhodnocení jednotlivých variant ošetření bylo zjištěno, že pro eliminaci sledovaného komplexu virů je nejefektivnější použití acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup>, a to rovněž z pohledu ekonomického.

V disertační práci byla dále zahájena optimalizace relativní kvantifikace viru *Garlic common latent virus*. Po přetestování souboru izolátů negativních na přítomnost viru dle RT-PCR bylo detekcí metodou Real-Time PCR pozorováno vyšší procento izolátů pozitivních na přítomnost GCLV. Optimalizace metody pro další viry bude předmětem dalších výzkumů.

## ABSTRACT

The dissertation „Možnosti využití antivirotik v procesu eliminace virů u česneku kuchyňského“ is focused on the effect of three antivirals (acyclovir, rimantadine or zidovudine) for their potential use in the process of chemotherapy in the combination of meristem culture method as a possible method for *Onion yellow stripe virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Garlic common latent virus* and *Shallot latent virus* eradication in *in vitro* conditions.

Antivirals were always applied separately into cultivation media and two amounts of antivirals (25 or 50 mg.l<sup>-1</sup>) were used. The treatment time was two weeks. Meristem culture only was a control method. Murashige and Skoog medium was used for all variants.

During the first year, young plants of the variety 'D'Alsace Freres' cultivated *in vitro* were treated with chemotherapy. These plants had been treated with the meristem culture only in the past but the treatment hadn't been successful. The virus presence was detected with the ELISA method.

Rimantadine variant in the amount of 50 mg.l<sup>-1</sup> was the most effective variant for the monitored virus's elimination.

More sensitive method reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was optimized for monitored viruses in the next parts of this work. *Garlic common latent virus* (GCLV) primers were designed as well.

During the second year, the chemotherapy was applied on explants with the size 0.8 mm during meristem culture. Explants of the varieties 'Blanin', 'Sukoradský' and 'Japo', however, did not regenerate and the chemotherapy could not be evaluated.

In the next two years of the work, the chemotherapy was applied on individual cloves of the 'Unikát' variety. Whilst detecting the presence of viruses in plants prior the treatment, it was established that only one plant was free from all the monitored viruses. After treatment, acyclovir variant in amount of 25 mg.l<sup>-1</sup> was evaluated as the most effective variant for the virus complex elimination, and also from the economical point of view.

Real-Time PCR method for viruses' detection has been started in the dissertation. The detection of GCLV was optimized from the start. Isolates which had been negative for the GCLV presence after RT-PCR were tested with Real-Time PCR. A higher percentage of GCLV positive plants were detected with Real-Time PCR. Real-Time PCR optimization for other viruses will be the objective of future experiments.

## Obsah

1	ÚVOD.....	13
2	CÍL.....	15
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	16
3.1	Obecná charakteristika česneku kuchyňského ( <i>Allium sativum</i> L.).....	16
3.1.1	Klasifikace česneku .....	16
3.1.2	Morfologie česneku .....	17
3.1.3	Obsahové látky česneku.....	18
3.1.4	Použití, význam česneku.....	18
3.1.5	Choroby a škůdci česneku .....	18
3.2	Virové choroby.....	19
3.2.1	Taxonomie virů.....	20
3.2.2	Charakteristika rostlinných virů (fytovirů).....	20
3.2.3	Napadení buňky virem.....	21
3.2.4	Pohyb viru v rostlině.....	21
3.2.5	Replikace virů .....	22
3.2.6	Přenos a šíření virů mezi hostiteli.....	22
3.2.7	Přenos virů pomocí vektorů.....	22
3.2.8	Symptomy virových chorob.....	23
3.3	Metody detekce virových chorob.....	24
3.3.1	Vizuální metody.....	24
3.3.2	Biologické metody .....	25
3.3.3	Sérologické metody .....	25
3.3.4	Elektronová mikroskopie.....	25
3.3.5	Molekulární markery .....	26
3.4	Virové patogeny česneku .....	27
3.4.1	Rod <i>Potyvirus</i> .....	28
3.4.2	Rod <i>Carlavirus</i> .....	33

3.4.3	Rod <i>Allexivirus</i> .....	36
3.4.4	Rod <i>Fijivirus</i> .....	37
3.5	Metody eliminace rostlinných virů v podmínkách <i>in vitro</i> .....	38
3.5.1	Meristémové kultury .....	38
3.5.2	Chemoterapie .....	41
3.5.3	Termoterapie .....	47
3.5.4	Kryoterapie .....	47
3.5.5	Elektroterapie .....	47
3.5.6	Silice .....	48
4	MATERIÁL A METODIKA .....	49
4.1	Rostlinný materiál .....	49
4.2	Živné půdy (médiá) .....	51
4.3	Převod rostlin do aseptických podmínek .....	52
4.4	Chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou .....	53
4.5	Kontrolní varianta .....	56
4.6	Kultivační podmínky .....	56
4.7	První rok experimentu .....	57
4.7.1	Působení antivirotik na mladé rostliny neúspěšně ozdravené meristémovou kulturou .....	57
4.7.2	Detekce virů metodou ELISA .....	57
4.7.3	Testování česneku reverzně transkripční polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) a porovnání s výsledky metody ELISA .....	60
4.8	Druhý rok experimentu .....	64
4.8.1	Detekce virů před aplikací chemoterapie a izolaci meristému .....	64
4.8.2	Chemoterapie: působení antivirotik na izolované růstové vrcholy .....	65
4.9	Třetí a čtvrtý rok experimentu .....	65
4.9.1	Detekce virů před a po aplikaci chemoterapie a izolaci meristému .....	65
4.9.2	Chemoterapie: působení antivirotik na stroužky .....	66

4.9.3	Polymerázová řetězová reakce.....	66
4.9.4	Navržení primerů pro detekci viru <i>Garlic common latent virus</i> .....	67
4.9.5	Relativní kvantifikace viru <i>Garlic common latent virus</i> (Real-Time PCR) 68	
4.10	Použité statistické metody.....	70
5	VÝSLEDKY.....	71
5.1	Chemoterapie: Působení antivirotik na mladé rostliny neúspěšně ozdravované meristémovou kulturou.....	71
5.2	Srovnání výsledků testování <i>in vitro</i> rostlin česneku kuchyňského na přítomnost virů metodou ELISA a metodou RT-PCR.....	74
5.3	Zjištění přítomnosti virů před aplikací chemoterapie a meristémové kultury .	76
5.4	Chemoterapie: Působení antivirotik na izolované růstové vrcholy odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' (druhý rok řešení disertační práce).....	77
5.5	Chemoterapie: Působení antivirotik na stroužky.....	78
5.6	Nové systémy pro detekci a kvantifikaci viru <i>Garlic common latent virus</i> .....	83
5.6.1	Relativní kvantifikace viru <i>Garlic common latent virus</i> (Real-Time PCR) 84	
5.6.2	Sekvence: Objasnění nejednoznačných výsledků při detekci viru GCLV 86	
5.6.3	Validace Real-Time PCR.....	86
5.6.4	Porovnání výsledků metody RT-PCR a metody Real-Time PCR pro detekci viru GCLV.....	88
6	DISKUSE.....	90
6.1	<i>In vitro</i> kultivace rostlinného materiálu.....	90
6.2	Zjištění přítomnosti virových patogenů před chemoterapií.....	91
6.3	Porovnání testování metodou ELISA a RT-PCR.....	93
6.4	Eliminace virů u česneku kuchyňského.....	94
6.4.1	Chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou.....	94
6.4.2	Kontrolní varianta (meristémové kultury).....	98



6.5	Relativní kvantifikace viru <i>Garlic common latent virus</i> (Real-Time PCR) ....	99
7	ZÁVĚR .....	101
8	SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ .....	103

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Genotyp česneku 'D'Alsace Freres' (autor fotky: Ing. Stavělíková, Ph.D.).	49
Obrázek 2 Genotyp česneku 'Unikát' .....	51
Obrázek 3 Širokohrdlé (a) a úzkohrdlé (b) zkumavky pro in vitro kultivaci česneku....	53
Obrázek 4 Působení antivirotik na mladé rostliny česneku neúspěšně ozdravené meristémovou kulturou .....	55
Obrázek 5 Izolovaný růstový vrchol (meristém s ponecháním jednoho až dvou základů listů). Foto: Ing. Naušová .....	56
Obrázek 6 Výsledná barevná reakce detekce ELISA, žlutá políčka jsou pozitivní.....	60
Obrázek 7 Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru OYDV po chemoterapii.....	71
Obrázek 8 Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru LYSV po chemoterapii.....	72
Obrázek 9 Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru SLV po chemoterapii.....	73
Obrázek 10 Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru GCLV po chemoterapii.....	74
Obrázek 11 Srovnání detekce virových patogenů metodou ELISA a RT-PCR u 100 rostlin česneku kuchyňského kultivovaného in vitro.....	75
Obrázek 12 Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru Onion yellow dwarf virus .....	79
Obrázek 13 Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru Leek yellow stripe virus.....	80
Obrázek 14 Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru Shallot latent virus.....	81
Obrázek 15 Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru Garlic common latent virus.....	82
Obrázek 16 Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od sledovaného komplexu virů .....	83
Obrázek 17 Vizualizace produktů na agarózovém gelu po detekci viru Garlic common latent virus metodou RT-PCR dle primerů Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011).....	84

Obrázek 18 Vizualizace produktů na agarózovém gelu po detekci viru Garlic common latent virus metodou RT-PCR s použitím navržených primerů.....	84
Obrázek 19 Příklad průběhu Real-Time PCR u náhodných 15 izolátů česneku odrůdy 'Unikát' .....	87
Obrázek 20 Příklad vizualizace produktů PCR na agarózovém gelu po detekci viru Garlic common latent virus metodou Real-Time PCR.....	88
Obrázek 21 Porovnání detekce přítomnosti viru GCLV metodou RT-PCR a metodou Real-Time PCR.....	89

## Seznam tabulek

Tabulka 1 Sekvence primerů pro detekci OYDV, LYSV, SLV, GCLV .....	64
Tabulka 2 Termíny a počty stroužků odrůdy česneku 'Unikát' převedných do aseptických podmínek u jednotlivých variant .....	66
Tabulka 3 Sekvence primerů pro detekci GCLV .....	67
Tabulka 4 Primery navržené pro Real-Time reakci .....	68
Tabulka 5 Kombinace směsných infekcí v rostlinách česneku odrůdy 'Unikát' .....	76
Tabulka 6 Kombinace virových patogenů v rostlinách česneku odrůdy 'Unikát' .....	77
Tabulka 7 Převody stroužků a vyhodnocení růstu odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' .....	78
Tabulka 8 Počet převedených stroužků odrůdy česneku 'Unikát' u jednotlivých variant .....	78
Tabulka 9 Rozdílnost výsledků detekce viru GCLV při použití různých metod.....	85
Tabulka 10 Příklad detekce viru GCLV metodou Real-Time PCR u náhodných 15 izolátů česneku odrůdy 'Unikát' .....	86

## 1 ÚVOD

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) patří k nejstarším kulturním plodinám, které provází lidstvo již od dávných dob. Je řazen do čeledi *Alliaceae* (česnekovité), která zahrnuje další hospodářsky významné plodiny (především cibuli, pór nebo pažitku). Světově je česnek druhá nejvýznamnější plodina z rodu *Allium*. Je ceněn jako zelenina, koření, ale také jako léčivá rostlina, především pro své antibiotické účinky. Díky pozitivnímu vlivu česneku na zdraví člověka jeho popularita a pěstování neustále stoupá.

Pěstování a výnos česneku negativně ovlivňují virové patogeny. Viry působí na kvalitu i kvantitu produkce česneku, což může vést k vysokým ekonomickým ztrátám. Je známo několik patogenních virů, které se vyskytují ve všech oblastech pěstování česneku. Ve mnoha případech je česnek infikován komplexem dvou a více virů. K nejdůležitějším rodům virů napadajících česnek a celý rod *Allium* patří rody *Potyvirus* (*Onion yellow dwarf virus* a *Leek yellow stripe virus*), *Carlavirus* (*Garlic common latent virus* a *Shallot latent virus*) a *Allexivirus*, a dále také *Fijivirus* (*Garlic dwarf reovirus*). Česnek mohou napadat také další viry, nemají ale ekonomický význam a jejich výskyt je většinou pouze lokálního charakteru.

Vegetativní množení a vektorový přenos jsou hlavní způsoby šíření virových chorob. Vzhledem k tomu, že česnek je množěn výhradně vegetativně, jsou virové choroby u této plodiny závažný problém. Virové choroby se u česneku projevují převážně mozaikami, proužkovitostí, zakrslostí a celkově oslabeným vývojem rostlin. Jednotlivé viry mohou také zůstat v latentní formě a vizuální příznaky se neobjevují.

Jednou z cest vedoucích k eliminaci virových patogenů je ozdravování česneku v podmínkách *in vitro*. K metodám, které jsou v současnosti využívány, patří především meristémové kultury, termoterapie, chemoterapie, kryoterapie, nebo nejčastěji jejich kombinace.

Tato práce je zaměřena na výzkum chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou a studium nových látek, které by mohly být účinné pro eliminaci virových patogenů u česneku. V literatuře se již nacházejí informace o eliminaci virů u různých druhů rostlin právě pomocí chemoterapie (např. *Malus domestica*, *Vitis vinifera*, *Cynara Kolymu*, *Fragaria Virginiina*, orchideje, *Allium sativum*).

U česneku kuchyňského byly ale zatím experimenty s eliminací virů prováděny pouze s využitím antivirotika ribavirin. Ribavirin byl primárně používán v humánní

medicině k léčbě hepatitidy C, nemocí dýchacích cest a chřipky. Ozdravování je v této práci rozšířeno o použití nových, v rostlinolékařství dodnes i nepoužívaných chemikálií, u kterých je předpoklad, že by mohly vést k eliminaci virových patogenů česneku. Jedná se o látky, které mají v humánní medicíně podobné účinky jako ribavirin, tzn. antivirotické.

## 2 CÍL

Cílem práce je experimentálně ověřit vliv látek s antivirovými účinky pro jejich možné použití při eliminaci virů u česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.). Práce je konkrétně zaměřena na eliminaci komplexu čtyř virů napadajících česnek (*Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Garlic common latent virus* a *Shallot latent virus*).

K jednotlivým dílčím cílům, které povedou k ozdravení vybraných genotypů česneku kuchyňského, patří převod rostlin česneku kuchyňského do aseptických podmínek, detekce přítomnosti virových patogenů v rostlinách před procesem chemoterapie, samotná aplikace chemoterapie, detekce přítomnosti virových patogenů v rostlinách po ošetření chemoterapií a celková evaluace úspěšnosti ošetření. Pozorování zdravotního stavu rostlin jak z pohledu mikrobiálních infekcí, tak z pohledu vlivu antivirotik na kondici rostlin je posledním dílčím cílem práce.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Obecná charakteristika česneku kuchyňského (*Allium sativum* L.)

Česnek kuchyňský je světově druhá nejvýznamnější plodina rodu *Allium*. V mnoha světových kuchyních je využíván jako koření a zelenina (Brewster, 2008). Je pravděpodobně jednou z nejstarších rostlin, kterou člověk sbíral, konzumoval a začal účelově zkulturnovat (Jureva a Kokoreva, 1992). Popularita a pěstování česneku od sedmdesátých let 20. století stoupá, a to především díky jeho příznivým vlivům na zdraví člověka (Brewster, 2008).

Původ česneku (*Allium sativum* L.) je lokalizován v centrální Asii, kde se vyvinul pravděpodobně z planého druhu *Allium longicuspis* Regel. Některé studie ovšem uvádí, že *A. longicuspis* je zcela odlišný druh, který se stejně jako *A. sativum* vyvinul z druhu *Allium tuncelianum* (Brewster, 2008).

##### 3.1.1 Klasifikace česneku

Česnek je řazen do rodu *Allium* (česnek), čeledi *Alliaceae* (česnekovité), řádu *Aspargales* (chřestotvaré), třídy *Liliopsida* (jednoděložné) a oddělení *Magnoliophyta* (krytosemenné) (Brewster, 2008).

Fritsch a Friesen (2002) dělí česnek na skupiny:

*Longicuspis* – skupina z centrální Asie vybíhající do květu a tvořící mnoho malých pacibulek, přičemž někteří zástupci produkují fertilní osivo,

*Sativum* – skupina ze Středomoří zahrnující paličáky i nepaličáky,

*Ophioscorodon* – skupina ze střední a východní Evropy s dlouhými stonky a malým počtem větších pacibulek,

Pekingská – čínská skupina vyvinuta z *A. longicuspis*, rostliny jsou menší a produkují malý počet větších pacibulek,

Subtropická – skupina z Indie, Vietnamu, Myanmaru, s malými cibulemi, selektovaná pro konzumaci čerstvých listů.



Klasifikace dle Kuzněcova (Kóňa a Kóňová, 2005):

ssp. *Sagittatum* – česnek paličák s třemi ekotypy – Středoasijský, Kavkazsko-karpatský a Východo-středomořský,

ssp. *Vulgare* – česnek nepaličák s třemi ekotypy – Kontinentální, Jihomořský a Jihoruský.

### 3.1.2 Morfologie česneku

Česnek je víceletá plodina, u nás pěstovaný jako jednoletá nebo dvouletá zelenina. Jako u všech zástupců rodu *Allium* je i u česneku tvořen svazčitý kořenový systém. Dělená cibule je složena ze stroužků (metamorfované báze listů) (Záborský 1992) vyrůstajících z podpučí (zkrácený stonek) (Podešva 1959, Lužný a Vaško 1982). Stroužky jsou zásobní a rozmnožovací orgány, které se vyvinuly z kolaterálních pupenů (Záborský 1992). Dužina je tvořena zásobním pletivem dužnatého listu. Velikost a počet stroužků jsou odrůdové znaky. Stroužky jsou spojeny průsvitnými jemnými suknicemi (6 – 10) v kompaktní cibuli.

Uvnitř každého stroužku se nachází růstový vrchol chráněný dužnatým zásobním listem. Jsou v něm obsaženy živiny nezbytné pro vývoj mladých rostlin česneku. Je složen ze stříškovitě uspořádaných základů listů s počtem odpovídajícím definitivnímu počtu vnějších listů (Block, 2010 in Sapáková, 2013).

Listy česneku jsou ploché, žlábkovité, světle až sivo zelené a ojínné, s listovými pochvami, které objímají květní stvol. Počet listů je 4 až 16 (Podešva 1959, Lužný a Vaško 1982).

Květní stvol je u paličáků 0,8 až 1 m vysoký, také vyrůstající z podpučí, ukončený lichookolíkem řídce rozložených sterilních kvítků, který je obalen v toulci. Jednotlivé květy jsou složeny z 6 okvětních lístků zelenavě bílé až růžové barvy. Podle Kuzněcova plané formy ve své domovině ve střední Asii v nadmořských výškách 3000 metrů kvetou a tvoří semena. Kulturní formy ale semena netvoří. U sterilních forem bývají prašníky žlutozelené, smršťené, matné, v normálním stavu červenofialové, lesklé. Mezi jednotlivými květy se nacházejí dužnaté vegetativní útvary – pacibulky, které mohou rovněž sloužit k vegetativnímu množení (Petříková, 2006).

### 3.1.3 Obsahové látky česneku

Rod *Allium* obsahuje sloučeniny síry, které mu dodávají typický zápach a štiplavost, glykosidně vázané silice, fytoncidy, vitaminy A, C, D, skupiny látek podobné pohlavním hormonům, jod a další minerální látky a stopové prvky. Důležitý je obsah až 0,4 % alliinu, který je mechanickým narušením čerstvé tkáně za účasti enzymu alliinasy měněn na allicin, látku dávající česneku typickou chuť a zápach (Brewster, 2008; Kóňa a Kóňová, 2005). K látkám antibiotické povahy nalézajícím se v česneku patří také garlicin a ajoen (produkovaný z allicinu, s větší chemickou stabilitou, Hassan, 2004). Dále obsahuje látky s vlastnostmi insulínu. Suché cibule obsahují asi 30 až 40 % sušiny (Kóňa a Kóňová, 2005).

### 3.1.4 Použití, význam česneku

Česnek je u nás používán jako zelenina, koření, ale v hojně míře také jako léčivá rostlina. Česnek má antisklerotické účinky, snižuje vysoký krevní tlak, má protinádorové účinky a působí proti trombóze, dále česnek snižuje tvorbu krevních destiček (Li, 2000). Rozšiřuje cévy a brání vzniku tukových usazenin na stěnách cév. Snižuje hladinu cholesterolu a urychluje jeho vyplavování z těla (Kovička, 1998; Kóňa a Kóňová, 2005). Bown (2002) uvádí užívání česneku jako prevenci proti infekcím a chřipce, bronchitidě a černému kašli, a jeho diaforetické účinky. Česnek má pozitivní vliv na léčbu diabetu, rakoviny a astmatu.

Mimořádně ceněnou vlastností česneku jsou jeho antibakteriální, antimikrobiální, antivirové a protiplísňové účinky (Brewster, 2008; Hassan, 2004).

Celkově blahodárný vliv má na trávicí ústrojí (proti nadýmání, křečím a podporuje trávení).

### 3.1.5 Choroby a škůdci česneku

K fyziologickým poruchám česneku patří zasychání špiček listů (např. vlivem poškození kořenového systému, nedostatkem dusíku, suchem či výkyvy teplot), vytváření pacibulek v různých místech pseudostonku u skupiny odrůd polovybíhajících do květu, sluneční úžeh (Rod a kol., 2005; Stavělíková in Dušek, 2012) a porucha zvaná „waxy breakdown“. K tomuto poškození dochází pravděpodobně vlivem vysokých

teplot během pěstování či po sklizni nebo vlivem špatné ventilace a nízkého obsahu kyslíku během skladování. Stroužky jsou zapadlé, scvrklé, jantarové barvy dochází k měknutí (Schwartz a Mohan, 2006).

Houbové choroby vyskytující se na česneku jsou fusariová hniloba (patogen *Fusarium oxysporum*), modrá hniloba (patogeny rodu *Penicillium*), rzivost cibule (patogen *Puccinia alli*), bílá hniloba cibule (patogen *Sclerotium cepivorum*), sazovitost česneku (patogen *Helmithosporium allii*), plísňovitost cibule (patogen *Peronospora destructor* – plíseň cibulová) (Rod a kol., 2005), dále padlí způsobené patogenem *Leveillula taurica*) a další patogeny jako *Alternaria porri*, *Cercospora duddiae* (Brewster, 2008) a *Stemphylium vesicarium* (Suheri a Price, 2000).

K chorobám česneku bakteriálního původu patří fytoplasmová žloutenka aster (*Candidatus Phytoplasma asteris*) a měkká bakteriová hniloba cibule (*Erwinia carotovora*) (Táborský a Šedivý, 1997).

Mezi škůdce napadající česnek patří háďátko zhoubné (*Dityenchus dipsaci*), houbomilka česneková (*Suillia univittata*), vrtalka pórová (*Phytomyza gymnostoma*), třásněnka zahradní (*Thrips tabaci*), květílka cibulová (*Delia antiqua*), vlnovník česnekový (*Aceria tulipae*), molík česnekový (*Acrolepiopsis assectella*), larvy (drátovci) kovaříkovitých – *Elateridae* (Rod a kol., 2005), mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) (Eastop a kol., 2005), kořenohub zhoubný (*Rhizoglyphus echinopus*) (Bielska, 1975), chřestovničci rodu *Liriocercis* (Berti a Rapilly, 1976) a krytonosec cibulový (*Oprohinus suturalis*) (Tymčenko, 1987) a cibulovky rodu *Eumerus* (Brewster, 2008).

### 3.2 Virové choroby

Pojem „virus“ byl dlouho synonymem pro jed, „poison“. Příznaky virových chorob byly původně považovány za bakteriální infekce. V roce 1892 Iwanowski prokázal, že filtrát z rostlin tabáku infikovaných tabákovou mozaikou (v roce 1886 popsán Mayerem) je i po filtraci pro bakterie neprostupným filtrem stále infekční.

V roce 1898 pokus zopakoval Beijerinck a infekční agens nazval „contagium vivum fluidum“ (z lat. nakažlivá živoucí tekutina). Tento okamžik je označován jako počátek virologie. Až s rozvojem elektronových mikroskopů (Kausche a kol, 1939) a rentgenu (Bernal a Fankuchen, 1937) mohla být popsána struktura virů (Hull, 2004).

Viry jsou nebuněčné živé organismy, které se mohou rozmnožovat pouze

v hostitelských (metabolicky aktivních) buňkách a způsobovat onemocnění. Jsou to intrabuněční parazité. Viry jsou složeny z nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) a bílkovinného obalu (kapsid). Tento komplex je také nazýván nukleokapsid. Jako virion je označena jednotlivá virová částice viru schopna infikovat a množit se v hostitelské buňce. Většina živočišných virů má kolem nukleokapsidu ještě lipoproteinový obal, což vytváří tzv. obalené viry. Viry nemají vlastní aparát pro syntézu bílkovin ani metabolický aparát. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 25 nm až 400 nm a téměř všechny jsou submikroskopické, pozorovatelné pouze v elektronovém mikroskopu. Viry představují velmi heterogenní skupinu mikroorganismů jak v šíři hostitelů, tak ve struktuře a reprodukci. Genom rostlinných virů obvykle kóduje 4 až 12 proteinů, komplexnější živočišné viry až 250 proteinů. Tyto proteiny plní funkce zajišťující jejich replikaci a šíření, tzn. procesy nezbytné k přežití viru (Agrios, 2005; Astier a kol., 2007; Rosypal, 2002).

### **3.2.1 Taxonomie virů**

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) je výbor založený v roce 1962 zabývající se klasifikací virů, který řadí viry do řádů, čeledí a rodů. Cílem výboru ICTV je vývoj ustáleného univerzálního taxonomického schématu s cílem popsat všechny známé viry (Hull, 2004). Databáze ICTV (ICTVdB) nyní obsahuje více než 2800 druhů virů uspořádaných v 455 rodech a 103 čeledích (ICTV, 2015). V současné praxi je také používána Baltimorova klasifikace z roku 1971, která rozděluje viry do skupin dle nukleové kyseliny tvořící jejich genom.

### **3.2.2 Charakteristika rostlinných virů (fytovirů)**

Rostlinné viry tvoří asi polovinu všech popsaných virů. Fytoviry jsou vnitrobuněční obligátní parazité, kteří až na výjimky nemají schopnost překonávat celulósovou buněčnou stěnu. Rostlinné viry se liší od jiných rostlinných patogenů velikostí, tvarem, ale i jednoduchostí svého chemického složení, fyzikální strukturou, množením, translokací v hostiteli a symptomy. Fytoviry se skládají z 5 až 40 % z nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), která vždy nese infekčnost a z 60 až 95 % z proteinů, které samotné infekční nejsou. Kapsid tvoří pouze ochranný plášť nukleové

kyseliny, ale zvyšuje také její infekčnost, ovlivňuje přenositelnost viru vektorem a druhy příznaků, které způsobuje (Agrios, 2005).

Genom většiny rostlinných virů je tvořen pozitivní RNA (Nagy a Pogany, 2011; Rosypal a kol., 2002). Jedná se o největší skupinu virových patogenů rostlin, které způsobují závažné choroby ekonomicky významných rostlin.

Jak uvádí Scholthof a kol. (2011) jsou z vědecko-ekonomického pohledu nejvýznamnější rostlinné viry *Tobacco mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Potato virus Y a X*, *Cauliflower mosaic virus*, *African cassava mosaic virus* a *Plum pox virus*, *Brome mosaic virus*.

### 3.2.3 Napadení buňky virem

Reprodukční cyklus virů má pět fází: adsorpce na buňku, penetrace (průnik) do buňky, uvolnění a replikace virového genomu, skládání (maturace, zrání) virionů a uvolnění nových virionů z buňky (Rosypal, 2002).

Jelikož rostlinná buňka nemá na svém povrchu specifické receptory, které by vážaly protein kapsidu, k průniku viru do buňky rostlin dochází pasivním způsobem (na rozdíl od živočišných a bakteriálních virů), zpravidla při mechanickém poškození, poranění buněčné stěny. Proto se u rostlinných virů uplatňuje vektorový přenos. Pokud je ovšem poškození tak velké, že umírá hostitelská buňka, nepřežívá v ní ani vir. Jen zcela ojediněle mohou viry proniknout do rostliny průduchy (Agrios, 2005).

### 3.2.4 Pohyb viru v rostlině

V rostlině se vir pohybuje v rámci jedné buňky, symplasticky mezibuněčnými prostory spojujícími cytoplasmu sousedních buněk (plasmodesmata) a cévními svazky je vir transportován systematicky. Tento transport je řízen specifickými (transportními) proteiny, které jsou kódovány virovým genomem a hostitelem (movement proteins, MPs) (Fernández-Calvino a kol., 2011; Mahy a Van Regenmortel, 2010).

Pohyb viru v buňce je periferní a je nezbytný pro šíření virového genomu přes plasmodesmata do sousedních buněk. V rostlině se vir šíří cévními svazky. U všech ekonomicky významných virových infekcí jsou viry šířeny floémem do celé rostliny. Vir se multiplikuje v každé parenchymatické buňce, kterou infikoval. V listovém

parenchymu se vir pohybuje přibližně 1 mm (8 až 10 buněk za den). Některé viry mohou být transportovány také xylémem. Pro rozvoj systémové infekce je u některých virů nutná přítomnost pláštěvého proteinu (coat protein, CP), může jej však imitovat jiný virový protein nebo protein hostitele (Agrios, 2005; Mahy a Van Regenmortel, 2010).

### **3.2.5 Replikace virů**

Vir proniká do rostlinné buňky pouze přes místa mechanického poškození (např. přenos vektorem). Do buněčné cytoplazmy proniká pouze virová nukleová kyselina, spojuje se s ribozomy a pomocí RNA polymerázy a jiných proteinů, nutných k replikaci viru, způsobuje přenos genetické informace virů do rostlin. Replikace probíhá nejčastěji na membránách endoplazmatického retikula. U +ssRNA virů je virová RNA infekční sama o sobě (Rosypal a kol., 2002).

### **3.2.6 Přenos a šíření virů mezi hostiteli**

Jednotlivé viry mohou být přenášeny jedním nebo několika způsoby. Šíření virů je často spojeno s činností člověka, především při vegetativním množení reprodukčního, již infikovaného materiálu. K přenosu virů může docházet také generativní cestou.

V semenech bývají viry vázány na embrya, endosperm a testu. Pravděpodobnost přenosu virů semeny je v porovnání s vegetativním šířením nižší. Viry mohou být přenášeny také pylem. Přenos houbami (přes kořeny rostlin) je prokázán u minimálně 30 rostlinných virů. Nejčastěji se jedná o rody *Polymyxa*, *Spongospora* a *Olpidium* (Agrios, 2005). Dalším způsobem přenosu viru může být přenos mechanický. Uskutečňuje se pomocí nářadí, strojů, případně mechanickým třením listů o sebe. Mechanický přenos bývá využíván u experimentálních rostlin a pro detekci virových patogenů (Hull, 2004; Šefrová, 2006).

### **3.2.7 Přenos virů pomocí vektorů**

K přenosu viru dochází nejčastěji při příjmu potravy, ale také například pouhým dotykem, nebo kladélkem. Nejčastějšími přenašeči je hmyz, který často střídá hostitele.

A dále hmyz s bodavě sacím nebo kousacím ústním ústrojím. Patří k nim nejčastěji mšice, mery a křísi. Mezi vektory dále patří členovci, roztoči a parazitické houby. Epidemiologický význam mají půdní háďátka (třída hlístice, *Nematoda*) (Mahy a Van Regenmortel, 2010). Přenos viru vektory lze rozdělit na perzistentní a neperzistentní.

#### Perzistentní přenos

K přenosu je potřeba dlouhého sání. Vir se dostává potravou do těla přenašeče do zažívacího traktu, hemolymfy a slinných žláz. Projde celým tělem vektora a odtud kousacím nebo sacím ústrojím infikuje další rostliny. Vektor si ponechává infekčnost po dlouhou dobu, i celý život. Pokud se vir ve vektoru množí, jedná se o propagativní typ, pokud se nemnoží, hovoříme o cirkulativním přenosu. Největší koncentrace perzistentních virů je v cévních svazcích. Zvláštní případ je transovariální přenos u mšic z matky na potomstvo. Pokud je doba nutná k průchodu viru tělem vektora kratší než 3 hodiny, jedná se o semiperzistentní způsob (Mahy a Van Regenmortel, 2010; Šefrová, 2006).

#### Neperzistentní přenos

K přenosu viru stačí krátká doba sání (asi do minuty). Vektor si infekčnost uchovává jen krátkou dobu (max. několik hodin). Přenos probíhá mechanicky sacím nebo kousacím ústrojím vektora (Mahy a Van Regenmortel, 2010; Šefrová, 2006).

### 3.2.8 Symptomy virových chorob

Pokud je hostitelská buňka citlivá k infekci (v místě infekce se objevují lokální příznaky), dochází ke změnám v jejím metabolismu a dochází k začátku reprodukce viru (objevují se systémové příznaky). Výsledkem interakce vir – hostitel je choroba.

Dle reakce rostlin rozlišujeme imunitu (viry se nemnoží, nejsou pozorovány příznaky napadení virem, přítomnost viru není možné dokázat – rostlina není hostitelem viru), rezistenci (rostlina je hostitelem viru, ale bez viditelných příznaků napadení virem), toleranci neboli snášenlivost (vir se v hostiteli množí, má příznaky napadení, ale ty nejsou silné, často latentní, a nezpůsobují vážné ekonomické ztráty) a vnímavost (vir se v hostiteli silně množí, objevují se typické příznaky choroby, jsou zde časté ekonomické ztráty). Hypersenzitivita je reakce, kdy jsou příznaky limitovány pouze na napadenou buňku a její okolí, projevuje se nekrotickými lokálními lézemi (Hull, 2004).

Choroba se vyznačuje množением viru, poškozením funkcí rostliny a následným projevem symptomů. Jejich přítomnost se projevuje charakteristickými vizuálními příznaky, jako jsou barevné změny (světlezelené, bílé nebo žluté – ztráta chlorofylu a jiných pigmentů, mozaiky, žloutenky, pruhy, kresby), nekrózy na listech, změny tvaru (deformace, zakrslost, kroucení listů), vadnutí, nižší výnos, zhoršené chuťové vlastnosti a skladovatelnost a snížení imunity vůči dalším napadením. Viry obvykle zkracují délku života rostlin, pouze na virovou infekci ale rostliny umírají zřídka.

Uvedené příznaky mohou být pozorovány na částech rostlin (lokální), nebo na celých rostlinách (systematické). Nejčastěji se symptomy objevují na listech, mohou se ale také vyskytovat na stoncích, plodech, kořenech nebo květech.

Příznaky se mohou vyskytovat jen v některé fázi života rostliny a vlivem podmínek prostředí mohou na čas vymizet (např. vysoká či nízká teplota). Mnoho virů je ovšem latentních a neprojevují se žádnými viditelnými příznaky.

Příznaky se objevují nejen na úrovni makroskopické, ale také histologické a cytologické (Agrios, 2005; Hull, 2004).

### **3.3 Metody detekce virových chorob**

V minulosti byly detekce virových chorob založeny pouze na základě specifických symptomů, jako jsou lokální léze nebo typické symptomy na testovacích rostlinách. Později byly vyvinuty preciznější metody – sérologické metody a elektronová mikroskopie (vizuální identifikace virových částic) a nejnověji molekulární metody (Salomon, 2002), které jsou v detekci ještě citlivější (Lunello, 2005; Sanjeev a kol., 2007; Sutarya a Van Dijk, 1994).

#### **3.3.1 Vizuální metody**

Tradičně používané kontroly porostů česneku jsou založeny na vizuálním hodnocení rostlin. Tato metoda je však často nepřesná a nespolehlivá, protože některé rody virů nemusí v hostiteli vyvolat žádné symptomy. Naopak některé viry mohou vyvolávat podobné příznaky, a proto může dojít k jejich záměně. (Rabinowitch, Currah, 2002). Dalším problémem může být to, že příznaky virových chorob mohou být podobné příznakům deficitu živin, poškození vlivem špatného počasí, vlivem



znečištěného ovzduší, poškození pesticidy nebo poškození biotickými činiteli (Naidu a Hughes, 2003).

### **3.3.2 Biologické metody**

Principem biologických metod je přenos viru na indikátorové rostliny (nejčastěji tabák, rajče, merlík, bobovité rostliny) (Hull, 2004). Přenos může být mechanický (přenos mízou na bylinné indikátory), vektorový nebo přenos roubováním na indikátorové rostliny. Biologické testy jsou časově náročnější, ale v mnoha laboratořích jsou používány jak pro diagnostiku, tak pro udržení virových kultur (Hull, 2004; Naidu a Hughes, 2003).

### **3.3.3 Sérologické metody**

Imunologické metody jsou citlivé, specifické a velmi přesné. Patří k nejpoužívanějším diagnostickým metodám pro detekci rostlinných virů. K nejspolehlivějším a nejčastěji používaným technikám patří diagnostická imunoenzymatická metoda ELISA (z anglického Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Vyznačuje se vysokou specifičností a citlivostí, je zde možnost detekce více virů najednou (směsná antiséra). Pomocí testu ELISA lze získat i údaje o sérologické příbuznosti izolátů virů. Principem je specifická reakce antiséra (protilátky) s homologními antigeny, tzn. s daným virem. Reakce je vyhodnocena spektrofotometricky. Testování trvá od několika hodin až dva dny (Hull, 2004; Salomon, 2002; Smékalová a kol., 2010).

V rostlinné virologii je používána varianta DAS-ELISA test (Double antipody sandwich-ELISA), která je založena na principu dvojité reakce protilátka – antigen (Dovas a kol., 2001a; Conci a kol., 1999).

### **3.3.4 Elektronová mikroskopie**

Elektronová mikroskopie poskytuje velmi cenné informace o morfologii virových částic. Principem je identifikace virů vizualizací izolovaných virionů obarvených protilátkami (Dovas a kol., 2001a; Matthews, 1991). Je to velice citlivá a přesná

metoda, nicméně velmi náročná na vybavení, kvalifikované specialisty a finance, proto je méně často využívána (Naidu a Hughes, 2003; Salomon, 2002).

### 3.3.5 Molekulární markery

Při testování virových chorob pomocí molekulárních markerů jsou detekovány virové nukleové kyseliny (DNA nebo RNA). Základem pro většinu molekulárních identifikačních systémů je **polymerázová řetězová reakce** (dále jen PCR z anglického „*Polymerase Chain Reaction*“) (Šmarda a kol., 2005).

PCR je metoda, při které jsou amplifikovány fragmenty virové DNA, popř. cDNA, o známé sekvenci. Základem je opakovaná denaturace dvouřetězcové DNA (dsDNA) za přítomnosti specifických oligonukleotidů, které slouží jako primery pro následnou syntézu nového řetězce DNA za přítomnosti DNA polymerázy. Tyto primery vymezují sledovaný úsek DNA. Pro standardní PCR jsou používány dva specifické primery – kódující (nebo také forward) a antikódující (nebo také reverse). Velikost primerů je většinou mezi 18 až 25 bázemi. Termostabilní polymerázy používané pro syntézu DNA jsou izolované nebo odvozené z termofilních organismů (*Thermus aquaticus*), které odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje Hull, 2004; Mullis a kol., 1986; Wolfe a Liston, 1998).

PCR je složena ze tří na sebe navazujících teplotních kroků. V prvním kroku při vysoké teplotě (92 až 95 °C, Sambrook a kol., 1989) dochází k denaturaci DNA a z dsDNA vznikají dvě oddělené jednořetězcové DNA (ssDNA). Ve druhém kroku – hybridizace primerů (nasedání primerů, annealing) – je teplota snížena (55 až 75 °C, Sambrook a kol., 1989) a pro výsledek PCR je zásadní. Specifické oligonukleotidy hybridizují se svou komplementární sekvencí na templátové DNA a následuje třetí krok – syntéza (extenze) nové DNA za účasti DNA polymerázy (Hull, 2004). Teplota je obvykle v rozmezí 72 až 78°C (Sambrook a kol., 1989). Teplotní cykly jsou prováděny v termocyklerech, přístrojích, kde je teplota měněna automaticky v časově naprogramovaných intervalech (McPherson a kol., 2006).

#### 3.3.5.1 Reverzně transkripční PCR (RT-PCR)

Reverzně transkripční PCR je typ PCR, při níž dochází nejdříve k přepisu genetické informace z molekuly RNA do DNA (cDNA, complementary DNA) za

pomoci enzymu reverzní transkriptázy, protože RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR. Jelikož většina rostlinných virů obsahuje genetickou informaci v podobě RNA, je tato metoda využívána právě pro detekci rostlinných virových patogenů.

V první fázi je nutná izolace celkové RNA příslušného vzorku (jedná se o směs t-RNA, rRNA, mRNA a virové RNA), přičemž výsledná izolovaná RNA je velmi vysoké čistoty. Po ní následuje přepis (transkripce) RNA do cDNA, která již vstupuje do běžné PCR reakce. Práce s RNA je technicky náročnější než s DNA, díky snadné degradaci enzymy RNázami, které jsou kontaminanty nejen vzorků, ale také chemikálií a pracovních nástrojů. Tyto enzymy rovněž odolávají i běžné sterilizaci, jejich inaktivace je možná např. pomocí látky DEPC (diethylpyrokarbonát) (Šmarda a kol., 2005).

### **3.3.5.2 Kvantitativní PCR (Real-Time PCR)**

Jedná se o metodu PCR umožňující přímou identifikaci PCR produktů v průběhu reakce. Kvantifikace je prováděna prostřednictvím detekce a fluorescenčního signálu v zařízení, které umožňuje nejen cyklické střídání teplot, ale také detekci fluorescence a monitorování postupu PCR v reálném čase. Produkty již není nutné detekovat elektroforeticky (Šmarda a kol., 2005). Existují tři obecné metody založené buď na použití interkalačního barviva vázajícího se na DNA, nebo fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu nebo fluorescenčně značených primerů (Logan a kol., 2009; Šmarda a kol., 2005). Lunello a kol. (2004) uvádí, že například použití Real-Time RT-PCR testu na bázi Taqman sond je až  $10^6$  krát citlivější než test DAS-ELISA pro detekci virů LYSV a OYDV.

## **3.4 Virové patogeny česneku**

Česnek napadá řada virů, které jsou rozšířené po celém světě a způsobují vážné ztráty na výnosu plodin a zhoršení jejich kvality (Bai a kol., 2010; Bos, 1982; Dovas, 2001; Delecolle a Lot, 1981). Výzkum virových infekcí česneku začal ve dvacátých letech 20. století v USA, kdy bylo detekováno žloutnutí, mosaiky a zakrslost (odtud onion yellow dwarf) jako virová choroba na cibuli (Melhus a kol., 1929 in Bos, 1982; Henderson, 1935 in Bos, 1982). Od této doby vzniká mnoho prací zabývajících se viry napadající zástupce rodu *Allium*. V České republice, resp. v Československu, se

výzkumem těchto virů zabývali např. Novák (1959), Blatný (1961), Špánik a kol. (1961), Havránek (1971), Brčák (1975), Klukáčková a kol. (2004), Navrátil a kol. (2005).

Je známo několik patogenních virů česneku, z toho ve většině případů je česnek infikován komplexem dvou a více virů (Delecolle and Lot, 1981; Smékalová a kol., 2010). K nejdůležitějším rodům virů napadajících česnek a celý rod *Allium* patří rody *Potyvirus* (*Onion yellow dwarf virus* a *Leek yellow stripe virus*), *Carlavirus* (*Garlic common latent virus* a *Shallot latent virus*) a *Allexivirus* (Mite-borne viruses) (Keller a kol., 2012). Na česneku se mohou vyskytovat i další viry, mají však pouze velice malý nebo lokální význam (Diekmann, 1997; Bos, 1982).

Vzhledem k tomu, že česnek je množen výhradně vegetativně, jsou virové choroby u této plodiny závažným problémem. Jak uvádí mnoho autorů (Carfune a kol., 2006; Canavelli a kol., 1998; Lot a kol., 1998; Walkey a Antill, 1989), nejvýznamnější ztráty na výnosu česneku jsou způsobeny celým komplexem virů.

Komplex těchto hlavních virů se u česneku projevuje převážně mozaikami, proužkovitostí, žloutnutím, zakrslostí a celkovým oslabeným vývojem rostlin. Viry mají špatný dopad nejen na jedince, ale i na celý porost a hrají důležitou roli ve výnosu. Některé viry mohou zůstat v latentní formě (Conci a kol., 2002; Caciagli, 2008; Van Dijk, 1993; Dovas a Vovlas, 2003).

### 3.4.1 Rod *Potyvirus*

Rod *Potyvirus* je jeden z osmi rodů patřících do čeledi *Potyviridae*, která byla objevena a vyhlášena v roce 1959. Tato čeleď je nejpočetnější skupinou rostlinných virů, řadíme k ní 146 druhů. (Agrios, 2005; Hull, 2004; ICTV, 2015; Khan, Dijkstra, 2002). Mnoho z nich způsobuje značné ztráty u zemědělských, zahradních i okrasných plodin (Chen a kol., 2001; Dovas a kol., 2001). Název rodu a jeho základní charakteristika jsou odvozeny od typového člena Y viru bramboru (*Potato virus Y*, PVY) (ViralZone, 2015).

Virové částice rodu *Potyvirus* jsou vláknité o rozměrech 11-15 nm x 680-900 nm. Genom rodu *Potyvirus* je kódován jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 10000 nukleotidů, který bývá obklopený téměř 2000 kopiemi coat proteinu (CP). Tento řetězec obvykle kódují geny označované jako HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa, VPg, NIb, CP (Urcuqui-Inchima a kol., 2001). Šíření viru v hostiteli se účastní několik

proteinů, žádný ale není jednoznačně klasifikován jako řídící. V cytoplazmě infikovaných buněk je možno pozorovat typické spirálovité inkluze složené z molekul helikázy (Rosypal, 2002; Agrios, 2005).

Viry rodu *Potyvirus* jsou téměř výhradně přenosné mšicemi neperzistentním způsobem, k nejvýznamnějším rodům patří *Aphis*, *Myzus* a *Macrosiphium*. Úspěšný přenos je zajišťován především polyfágními vektory (např. *Myzus persicae*, napadající také česnek). Proces přenosu viru mšicemi je zajišťován tzv. helper proteiny (HC-Pro) a proteinem kapsidu (CP), které jsou kódovány virovým genomem (Agrios, 2005; Raccach a kol., 2001). Někteří zástupci jsou přenášeni osivem (Agrios, 2005; Hull, 2004).

Symptomy se projevují jako mozaiky, skvrnitosti, chlorotické kroužky nebo barevné narušení na listech, květech, plodech a stoncích. Většina zástupců způsobuje zakrslosti, deformace a nekrózy různých rostlinných pletiv a drasticky redukuje výnosy (Agrios, 2005). Ramírez-Malagón a kol. (2006) uvádí, že rostliny česneku prosté virů rodu *Potyvirus* vykazují v polních podmínkách delší stonky s větší čerstvostí i sušenou hmotností cibule a také vyšší výnos.

K významným virům tohoto rodu napadajícím česnek patří *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) a *Leek yellow stripe virus* (LYSV). K dalším, především ekonomicky významným virům, patří z globálního pohledu např. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) a *Plum pox virus* (PPV) (Raccach a kol., 2001).

#### **3.4.1.1 *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) – vir žluté zakrslosti cibule**

OYDV je hlavní virový patogen cibule a česneku (Arya, 2006; Lot a kol., 1998), který byl primárně detekován na rostlině *Allium cepa* L. (Melhus a kol., 1929). OYDV je kosmopolitně se vyskytující vir, který napadá celý rod *Allium* (Chen a kol., 2003; Van Dijk, 1993). Celosvětově se jedná o hlavního zástupce virového komplexu na česneku (Lot a kol., 1998). Běžně se vyskytuje na cibuli, šalotce a česneku, ale i na dalších, také okrasných, druzích (Diekmann, 1997; Salomon a kol., 1996). Kromě mšic je tento vir šířen především množitelským materiálem. Přežívá v infikovaných cibulích, stroužcích, pacibulkách, ve vytrvalých zeleninách, v okrasných a volně rostoucích druzích rodu *Allium*.

## Genom

Genom OYDV je kódován jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 10459 nukleotidů. Tento řetězec kóduje 10 genů, které se nazývají P1 protein, HC-Pro protein, P3 protein, 6K1 protein, CI protein, 6K2 protein, VPg protein, NIa-Pro protein, NIb protein a CP protein (Celli a kol., 2013). Jedná se o jeden z nejagresivnějších virů, který je celosvětově rozšířen (Chen a kol., 2003; Van Dijk, 1993).

## Symptomy

Symptomy se objevují nejprve na listech rostoucích přímo z infikovaných cibulí jako četné krátké žluté proužkování na bázi. Příznaky primární infekce objevující se na listech se později v sezoně ztrácí a listy se jeví jako zdravé. S vývojem nemoci infikovaných listů přichází brzy kompletní chloróza, částečné zploštění a zkroucení listů a listy nabývají neobvyklého vzhledu. Úzké proužky se objevují také na květních stoncích, které se kroucí. Dalším symptomem je zpomalený růst a zakrslost. To vedlo k pojmenování choroby *Onion yellow* (Bos, 1982). Rostliny infikované OYDV vytváří deformovaná květenství nebo květenství se sterilními květy a netvoří semena (Šutić a kol., 1999). U cibule mohou vést virové infekce ke kompletní sterilitě rostlin určených pro produkci osiva - semenářského porostu (Larson a Walker, 1944). Infekce OYDV zhoršuje skladovatelnost, během níž dochází k předčasnému rašení (Diekmann, 1997). U česneku se symptomy neprojevují tak silně jako u cibule. Prvotní příznaky se objevují na listech. Na česneku se vytvářejí velice slabé chlorotické, světle žluté až žlutozelené podélné pruhy. Mohou přecházet ve žlutou mozaiku. Je redukována velikost cibulí a růst nadzemní části (Diekmann, 1997). Dle autorů Celli a kol. (2013), Conci a kol. (1999) a Van Dijk (1993) jsou izoláty viru z cibule a česneku odlišné. Izoláty z česneku infikují pouze česnek, izoláty z cibule infikují pouze cibuli. Navrátil a kol. (2007) nicméně zjistili, že izolát OYDV z česneku je možné inokulovat na cibuli. Pokud se OYDV vyskytuje v kombinaci s jinými viry, způsobuje větší poškození a ztráty. Příznaky jsou četnější a výraznější v chladném počasí (Diekmann, 1997).

## Výskyt

Smékalová a kol. (2010) detekovali OYDV v 80 % z 648 testovaných vzorků česneku z Oddělení genové banky v České republice. Klukáčková a kol. (2007) zjistila přítomnost OYDV u pěti českých genotypů česneku v 74 %. Dovas a kol. (2001b) detekovali OYDV na rostlinách česneku v Řecku v 98,5 %, Dovas a Vovlas (2003) v

Jižní Itálii v 98 %, Chodorska a kol. (2014) v Polsku. V některých místech v bývalé Jugoslávii byl OYDV detekován ve 40 % testovaného souboru (Šutić a kol., 1999). Shakraen a kol. (2008) detekovali v Iránu OYDV na česneku v 91,4 %. Dle Bai a kol. (2010) je míra rozšíření infekce OYDV 52 % v Evropě a 86 % v Asii. Vir byl detekován také na Novém Zélandu (Ward a kol., 2009), v Austrálii (Sward, Brennan, 1994), v Indii (Gawande a kol., 2013), v Indonésii (Sutarya a Van Dijk, 1994) v Brazílii a Japonsku (Fajardo a kol., 2001; Takaichi a kol., 1998). Většina autorů přitom uvádí, že procento rostlin pozitivních na OYDV se liší dle jednotlivých genotypů česneku.

### **3.4.1.2 *Leek yellow stripe virus (LYSV) – vir žluté proužkovitosti póru***

Podobné příznaky jako příznaky OYDV na cibuli popsal Bremer (1937) na póru (žluté proužkování, vadnutí a kadeření listů, snížení kvality a výnosu). Bylo ale zjištěno, že tento vir není patogenní na cibuli a šalotce (Bos, 1982) a sérologicky je pouze vzdáleně podobný OYDV. Vir byl popsán a pojmenován jako *Leek yellow stripe virus* (Bos a kol., 1978a). Výskyt v Československu byl pozorován a vizuálně popsán v roce 1959 (Novák, 1959). Na česneku byl poprvé popsán v práci Walkey a kol. (1987). Napadá výhradně rod *Allium*, především česnek a pór (Diekman, 1997; Bai a kol., 2010). Vůbec neinfikuje *A. fistulosum* (Šutić a kol., 1999). Lot a kol. (1998) a Van Dijk (1993) uvádí, že LYSV z póru nemůže infikovat, nebo pouze výjimečně, česnek.

### **Genom**

Genom LYSV je kódován jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 10142 nukleotidů. Tento řetězec kóduje 10 genů, které se nazývají P1 protein, HC-Pro protein, P3 protein, 6K1 protein, CI protein, 6K2 protein, NIa-VPg protein, NIa-Pro protein, NIb protein a CP protein (Chen a kol., 2001).

### **Symptomy**

Jednoduše rozpoznatelné chlorotické skvrny se nejprve objevují na bázi listů a postupně se šíří až k vrcholu, objevují se mozaiky. Během vývoje choroby se tyto žluté pruhy šíří, až pokryjí celý list a přichází kompletní chloróza. Čepele listů jsou vrásčité a zkroucené, listy jsou hrubé a více křehké. Rostliny mají pomalý růst, jsou více stresovány a umírají během zimy nebo jara. Stonky infikovaných rostlin jsou tenké, zakrslé a světlejší a podstatně redukováné kvality. Jsou citlivé na mráz (špatně snáší

ranní mrazy) a umírají buď v zimě nebo v předjaří (Bai, 2010; Diekman, 1997; Šutić a kol., 1999). U cibulí se objevuje hnědnutí (Bai a kol., 2010) a snížení hmotnosti (Lot, 1998). Vir je přenášen mšicemi (*Myzus persicae* nebo *Aphis fabae*) nebo mechanicky (Lunello a kol., 2002, 2007). I když k infekci dochází během vegetace, mohou se symptomy objevit až v říjnu (Šutić a kol., 1999).

### **Výskyt**

Smékalová a kol. (2010) detekovali LYSV v 65 % z 648 testovaných vzorků česneku. Klukáčková a kol. (2004) zjistila průměrnou přítomnost LYSV ve vzorcích z Oddělení genové banky v 61 % a u česneku pocházejícího z Číny dokonce v 87 %. Naproti tomu Barg a kol. (1994) detekovali LYSV pouze v několika vzorcích ze souboru vzorků česneku pocházejících z Jižní a Jihovýchodní Asie (kromě Číny). Dovas a Vovlas (2003) detekovali LYSV v 83% v Jižní Itálii, Dovas a kol. (2001b) v 83,7 % v Řecku. Conci a kol., (2002) detekovali v Argentině LYSV v česneku od 78 do 90 %, pouze v jedné provincii v 34 % (pravděpodobně díky nižší teplotě a silnému větru, který brání vývoji a pohybu mšic přenášejících vir). Van Dijk (1993) detekoval LYSV v česneku pocházejícím z celého světa 20% přítomnost a 45% přítomnost u planě rostoucích česneků z genové kolekce v Nizozemsku. Výskyt LYSV byl zjištěn v Austrálii, v Jižní Americe (Diekmann, 1997), v USA (Testen a kol., 2014). Na Novém Zélandu byl v roce 1981 detekován vir *Garlic yellow strike virus* (GYSV) (Mohamed a Young, 1981), později bylo ovšem potvrzeno, že se jedná pouze o jiný kmen viru LYSV (Wei, 2006). GYSV je tedy synonymum pro LYSV (Ward a kol., 2009).

### **Redukce výnosu působením patogenů rodu *Potyvirus***

Výskyt virů rodu *Potyvirus* infikujících česnek je celosvětový problém, protože způsobuje snížení výnosu napadených komodit a jelikož se česnek množí výhradně vegetativně, problémem jsou chronické infekce (Lot a kol., 1998).

OYDV může způsobovat až 60 a více procentní ztráty (Lot a kol., 1998; Elnagar a kol., 2009). Šutić a kol. (1999) uvádí, že výnosy zeleniny u jednoletých rostlin mohou být redukovány až o 25 %, kdežto potencionální výnos semen může být zredukován na 50-75 %. Dle Lunella a kol. (2007) může infekce LYSV redukovat hmotnost a obvod česneku až o 74 %.



Lot a kol. (1998) se zabývali infekcí OYDV, LYSV a jejich smíšenou infekcí na česneku. Zjistili, že příznaky LYSV se objevují později než příznaky rostlin napadených OYDV nebo společnou infekcí OYDV a LYSV. Délka listů napadených rostlin byla prokazatelně nižší u všech typů infekce oproti neinfikovaným rostlinám, hmotnost cibulí byla redukována v závislosti na genotypu a infekci o 18-85 %. Nejvyšší ztráty byly zaznamenány u směsné infekce (56-85 %), u infekce OYDV 30-65 %, u infekce LYSV 17-59 %. Další rok byly vysazeny infikované cibule a ztráta na hmotnosti cibule byla ještě větší (42-71 % OYDV, 39-62 % LYSV, 80-91 % směsná infekce).

### 3.4.2 Rod *Carlavirus*

Rod *Carlavirus* patří do čeledi *Betaflexiviridae* a je do něj řazeno 52 virů. Název rodu je odvozen od typového členu *Carnation latent virus*.

Virové částice jsou vláknité o rozměrech 12-13 nm x 470-1000 nm (ICTV, 2006a). Genom rodu *Carlavirus* je kódován jednovláknovou pozitivní RNA o velikosti 7400 až 9100 nukleotidů, který je obklopen 1600-2000 kopiemi obalového proteinu (tzv. CP) (Ryu a Lee, 2008 in Mahy a Regenmortel, 2010). Tento řetězec kóduje šest genů: RdRp, TGB 1, TGB 2, TGB 3, CP a cystein-rich protein (ViralZone, 2016; Zavriev, 1999 in Hull, 2004). Většina zástupců rodu *Carlavirus* vykazuje velmi mírné a slabé příznaky nebo mohou být latentní, často se objevují pouze sezónně nebo brzy po infekci mizí. Některé ovšem způsobují závažná onemocnění (např. *Pea streak virus* nebo *Poplar mosaic virus*), některé působí synergicky s jinými viry a jejich spolupůsobením dochází k velkému poškození plodiny. Např. přítomnost zástupců rodu *Carlavirus* zvyšuje ztráty způsobené rodem *Potyvirus* (Paludan, 1980; Sako, 1989). K většímu poškození může docházet u brambor, luskovin nebo borůvek.

Viry tohoto rodu jsou přenášeny primárně mšicemi neperzistentně nebo vegetativním množením, mechanicky, molicemi a výjimečně osivem (Agrios, 2005; Ryu a Lee, 2008 in Mahy a Regenmortel, 2010). Hostitelsky je rod *Carlavirus* méně specifický než *Potyvirus* (Katis a kol., 2012).

K významným zástupcům napadajícím rod *Allium* patří *Garlic common latent virus* (GCLV) a *Shallot latent virus* (SLV).

### 3.4.2.1 *Garlic common latent virus (GCLV)*

GCLV byl poprvé popsán ve Francii (Delecolle a Lot, 1981) a Německu (Graichen a Leistner, 1987) a pojmenován jako *Garlic latent virus* – GLV. Později byl přejmenován na *Garlic common latent virus* (Van Dijk, 1993), aby se předešlo jeho záměně s virem detekovaným v Japonsku (Lee a kol., 1979), pojmenovaným taktéž GLV. Bylo totiž zjištěno, že GCLV z Japonska je kmen viru *Shallot latent virus* (Tsuneyoshi a kol., 1998). Ve Francii a Německu jsou stále používána synonyma GLV (Katis a kol., 2012).

GCLV napadá primárně česnek, ale má široký okruh hostitelů v čeledi *Alliaceae* a dále v čeledích *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* a *Solanaceae* (ICTV, 2006b). Běžně se vyskytuje ve zdánlivě zdravých rostlinách (Šutić a kol., 1999). Vir je přenášen mechanicky nebo hmyzem, šíření viru ale způsobuje hlavně vegetativní způsob množení (Barg a kol., 1994, 1997).

#### **Genom**

Genom GCLV je kódován jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 8638 nukleotidů (Wylie a kol., 2012). Tento řetězec kóduje 6 genů: gen pro replikázu, triple gene block 1, TGB-2, TGB-3, CP protein, GCLV\_gp6 (nucleid acid binding protein).

#### **Symptomy**

Často se vyskytuje v latentní formě a většinou v hostitelské rostlině nevyvolává žádné symptomy. Dle Graichena (1991) zesiluje symptomy způsobené rodem *Potyvirus*.

#### **Výskyt**

Dle autora Diekmann (1997) je GCLV rozšířen v Evropě, Americe, Indii, Číně, dle Barg a kol. (1997) a také v Asijských zemích. Klukáčková a kol. (2004) testovali 111 vzorků česneku z různých komodit. GCLV byl z 93 % detekován ve vzorcích z Genové banky a z 33 % ve vzorcích komerčně vyprodukovaného česneku. V importovaném čínském česneku nebyl tento vir detekován. Klukáčková a kol. (2007) dále testovali 5 českých genotypů česneku na přítomnost GCLV. Z celkového počtu 463 rostlin byla zjištěna přítomnost viru v průměru u 99,6 %. U česneku importovaného z Číny nebyla přítomnost GCLV zjištěna. Smékalová a kol. (2010) detekovali GCLV

v 82 % z 648 testovaných vzorků. Senula a kol. (2000) testoval 100 vzorků česneku, u kterých byla ve více jak 90 % zjištěna přítomnost GCLV. Dovas a Vovlas (2003) detekovali přítomnost viru v Jižní Itálii mezi 23-98 %. Dovas a kol. (2001b) detekovali GCLV v centrální a jižní části Řecka. Přítomnost viru byla potvrzena také na Novém Zélandu (Ward a kol., 2009), v Oregonu (Gieck a kol., 2007), v Brazílii (Fajardo a kol., 2001), v Mexiku (Pérez-Moreno a kol., 2006) a v Turecku (Fidan a Baloglu, 2009). V Iránu byla zjištěn přítomnost viru pouze v jednom z devíti testovaných regionů (Shahraeen a kol., 2008).

### **3.4.2.2 *Shallot latent virus* – SLV (latentní vir šalotky)**

První zprávy o viru *Shallot latent virus* pocházejí z Holandska, kde byl popsán na *A. cepa var. ascalonicum* (Bos a kol., 1978b). O rok později byl v Japonsku izolován vir GLV (Lee a kol., 1979) na česneku, u něhož bylo ale zjištěno, že se jedná o kmen SLV infikující česnek (Tsuneyoshi a kol., 1998). V přírodních podmínkách je okruh hostitelů omezen na čeleď *Alliaceae*, uváděno je až 80 druhů (cibule, pór, česnek, šalotka, cibule zimní). Vir je šířen mechanickým způsobem nebo mšicemi neperzistentním způsobem (Šutić a kol., 1999).

#### **Genom**

Genom SLV je kódován jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 8371 nukleotidů. Tento řetězec kóduje 6 genů: gen pro replikázu, triple gene block 1, TGB-2, TBG-3, CP protein a NABP (nucleid acid binding protein) (Wylie a kol., 2012).

#### **Symptomy**

Symptomy se na hostiteli projevují stejným způsobem jako u GCLV. Vir se vyskytuje v latentní formě, pokud se vyskytují slabé symptomy na česneku, cibuli, šalotce a póru, vytváří se světle zelené proužkování na listech (Diekmann, 1997). Šutić a kol. (1999) uvádí, že na šalotce zůstává vir bez příznaků. V kombinaci s LYSV způsobuje těžkou chlorózu nebo bílé pruhování listů, někdy může dojít až k úhynu. (Paludan, 1980).

## Výskyt

SLV je rozšířen v zemích Asie a Evropy (Van Dijk, 1993; Barg a kol., 1994) a záznamy o výskytu jsou také z Mexika (Barg a kol., 1997) a z Brazílie (Mituti a kol. (2011 a 2015). Lze ho považovat za celosvětově se vyskytující (Bos, 1982 in Šutić a kol., 1999). Smékalová a kol. (2010) detekovali SLV v 83 % z 648 testovaných vzorků. Klukáčková a kol. (2007) zjistila průměrnou přítomnost SLV v pěti genotypch česneku u 81 % testovaných vzorků. Dovas a Vovlas (2003) testovali 120 rostlin česneku a přítomnost SLV byla potvrzena pouze u několika málo vzorků.

### 3.4.3 Rod *Allexivirus*

Tento rod je řazen do čeledi *Flexiviridae*. Do rodu *Allexivirus* patří skupina blíže nespécifikovaných virů označována souhrnným názvem *Mite-borne viruses*. Na rodu *Allium* byly poprvé popsány v Německu (Razvjzkina, 1971 in Dovas a kol., 2001b). První zmínky o rodu *Allexivirus* pocházejí z Ruska, kde byl v roce 1992 analyzován izolát viru z šalotky a pojmenován jako *Shallot virus X* (ShVX) (Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010). Rod dostal své jméno podle okruhu hostitelů, který napadá (čeleď *Alliaceae*) a typového členu *Shallot virus X* (ShVX) a byl vyhlášen v roce 1998. Bai a kol. (2010) uvádí pro tento rod také synonymum *Green X virus genus*.

Patří zde viry *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV), *Garlic mite-borne latent virus* (GarMbLV), *Garlic virus A, B, C, D, E, X*, *Shallot virus X* (Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010).

Rod *Allexivirus* infikuje především česnek, cibuli, šalotku, pór a divoce rostoucí druhy jako *A. ampeloprasum* (Diekmann, 1997; Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010). Viry jsou přenášeny mechanicky nebo roztoči, nejběžnější je *Aceria tulipea* (Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010; Kang a kol., 2007).

## Genom

Virové částice jsou flexibilní, vláknité, o délce přibližně 800 nm a průměru 12 nm (Agrios, 2005; Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010). Genom rodu *Allexivirus* je tvořen jednořetězcovou pozitivní RNA o velikosti přibližně 9000 nukleotidů, ve které je šest různých ORF (Kanyuka a kol., 1992).

## Symptomy

Příznaky a poškození jsou obvykle velmi mírné a často bez symptomů. Často jsou součástí komplexu virů, ale vzhledem k tomu, že nezpůsobují vážná onemocnění a nejsou ekonomicky významné, není jim věnována větší pozornost (Dovas a kol., 2001; Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010). Carfune a kol. (2006) pozorovali vliv *Garlic virus A* a *C* na výnos česneku a zjistili, že *Garlic virus C* způsoboval pouze mírné nebo nezpůsobil žádné poškození. Naproti tomu *Garlic virus A* způsobil u dvou odrůd 14-32% redukci hmotnosti cibulí a 6-11% redukci průměru cibulí v porovnání s kontrolou.

## Výskyt

Jmenované viry jsou rozšířeny kosmopolitně, obzvláště v regionech, kde jsou pěstovány cibuloviny. Díky snadnému přenosu u vegetativně množených cibulovin a přítomnosti roztočů je výskyt těchto virů v Evropě a Asii vysoký (hlavně u česneku a šalotky) (Diekmann, 1997). Záznamy o výskytu jsou z Brazílie (Melo Filho a kol., 2004), Argentiny (Conci a kol., 2003), Japonska (Takaichi a kol., 1998), Číny, Koreje, Thajska, Ruska, Holandska, Francie a Velké Británie (Zavriev, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010), Německa (Barg a kol., 1994), Slovinska (Barg a kol., 1997) a Řecka (Dovas a kol., 2001b). V České republice byl *Garlic mite-borne filamentous virus* detekován autorkami Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011). Z padesáti testovaných vzorků byl detekován v 88 % v prvním roce testování, ve druhém roce v 92 %.

### 3.4.4 Rod *Fijivirus*

Tento rod patří do čeledi *Reoviridae*. Dle Astier a kol. (2007) má 8 popsáných druhů. Typový člen je *Fiji disease virus* (Khan, Dijkstra, 2002, Caciagli, 2008 in Mahy, Regenmortel, 2010). Genom fjiivirů je tvořený dsRNA (Agrios, 2005). Všechny známé fjiiviry obsahují 10 lineárních genomických RNA (S1-S10), které jsou dvouřetězcové, velikost těchto RNA je přibližně v rozmezí 1400 až 4500 párů bází (Zhang a kol., 2008).

#### **3.4.4.1 Garlic dwarf reovirus (GDV)**

Virové části jsou ikosahedrické, dvouvrstevné, o průměru 65 - 70 nm. RNA je dvouřetězcová, segmentovaná. Vir není přenášen mechanicky, ale vektor přenášející tento vir není dosud znám. Pravděpodobně se jedná o skákavý hmyz. Vir je šířen také infikovaným materiálem. Hostitelem viru je česnek. Doposud je na česneku omezená distribuce viru a vir se vyskytuje jen omezeně, ale má vysoký potenciál pro zničení úrody česneku. Prvotní příznaky se projevují červenáním konečků bazálních listů. Většina napadených rostlin neprodělává normální vývoj. Příležitostně může vývoj probíhat normálně, ale později se buď netvoří internodia, nebo jsou zkrácena. Rostliny mohou mít vějířovitý vzhled. V některých případech se může zdát, že napadené zakrslé rostliny se znovuobnoví, uzdraví. Nicméně nové listy se opět objevují se zkrácenými internodii. Většina silně zakrslých listů bývá zbarvena tmavozeleně. Na žilnatině se mohou objevovat zduřeniny, nádorky. Cibule napadených rostlin mají hruškovitý tvar, jsou svráštělé, scvrklé, s houbovitou, porézní strukturou. I když některé stroužky mají normální velikost, většina jich je malých. Přítomnost viru byla zatím omezena pouze na areál jižní Francie (Diekman, 1997).

### **3.5 Metody eliminace rostlinných virů v podmínkách *in vitro***

Rostlinné viry je možné eliminovat několika metodami. Jedná se o metodu meristémových kultur, termoterapii, chemoterapii, kryoterapii a jejich kombinaci. Některé zdroje uvádějí také jako možnou metodu eliminace rostlinných virů elektroterapii nebo využití rostlinných silic.

#### **3.5.1 Meristémové kultury**

Meristémové kultury jsou využívány pro produkci viruprostého materiálu již mnoho let. Tato metoda se poprvé objevuje v pracích Morel a Martin (1952, 1955) u brambor a dahlie. Meristémové buňky tvoří prostředí, které není vhodné pro množení virů, tudíž zde jejich koncentrace bývá nejnižší. Virové částice, které mohou být přítomny ve vaskulárním systému, se mohou do buněk meristému dostat pouze mezibuněčnými prostory, což je velmi pomalý proces (Lizarraga a kol., 1986). U explantátových kultur je tato metoda nejvíce používána a nejlépe propracována

(Novák, 1990). Meristémových buněk je však málo a jsou těžko oddělitelné od infikovaných buněk (Ma a kol., 1994). Pro praxi platí, že čím je primární explantát menší, tím je pravděpodobnější vznik viruprostého jedince. Na druhou stranu čím je izolovaný vrchol menší, tím je nižší jeho životaschopnost (Novák, 1990).

Metoda eliminace virů u rodu *Allium* L. je známa od 60. let 20. století (Havránek, 1972; Kanichi a kol., 1969). V meristémovém pletivu česneku nejsou embryonální buňky napadeny nebo téměř vůbec napadeny virovými infekcemi, na rozdíl od virem infikovaných stroužků a jiných rostlinných tkání. Z toho důvodu mohou být rostliny pěstované z meristémové kultury viruprosté (Novák, 1990; Ohkoshi, 1991; Ma a kol., 1994). Nejlepší období k odebrání meristémů je podle Havránková, Havránek (1987) prosinec až leden.

Ondrušiková a kol. (2009) eliminovali komplex virů u 10 odrůd česneku kuchyňského pocházejícího z Oddělení genové Banky VÚRV v.v.i. v Olomouci pomocí meristémových kultur. Velikost meristémů byla 0,8 mm. Pro kultivaci meristémů bylo zvoleno MS médium s přídavkem NAA. Dva až tři měsíce po jejich kultivaci byly odebrány vzorky listových čepelí a testovány metodou ELISA. Autoři zjistili, že nejvíce perzistentní vir byl GCLV (úspěšnost eliminace pod 50 %), naopak v případě eliminace OYDV, LYSV a SLV byla úspěšnost vysoká (v průměru 70-80 %).

Naušová a kol. (2008) eliminovali metodou meristémových kultur komplex virů u 20 odrůd česneku pocházejícího z oddělení Genové Banky VÚRV v Olomouci. Velikost meristémů byla 0,8 mm. Pro kultivaci meristémů bylo zvoleno MS médium s přídavkem NAA. Dva až tři měsíce po kultivaci byly odebrány vzorky listových čepelí a testovány metodou ELISA. Průkazné rozdíly v eliminaci virů byly pozorovány mezi jednotlivými odrůdami a nejobtížněji byl eliminován vir GCLV. Viry OYDV, LYSV a SLV byly eliminovány s vysokou úspěšností.

Ramírez-Malagón a kol. (2006) uvádí, že léčbu pomocí metody meristémových kultur přežilo v průměru 41,7 % explantátů odrůdy 'Taiwan' a 34,3 % 'Chileno' a u obou těchto kultivarů byla úspěšnost eliminace virů z rodu *Potyvirus* 64 %. Pro detekci virů byla použita metoda ELISA. Jako kultivační médium bylo zvoleno Gamborgovo B-5 médium (0,5 mg.l<sup>-1</sup> 2-iP, 0,1 mg.l<sup>-1</sup> NAA, 0,8 % agar, pH 5,8).

Pateña a kol. (2005) nejprve izolovali ze stroužků explantáty velikosti 15-20 mm x 1,5 mm a po měsíci proběhla izolace meristémů o velikosti 0,3 až 0,5 mm. Stroužky

byly předtím ošetřeny teplotou 5°C po dobu 1 až 4 týdnů a následným umístěním ve vodě o teplotě 50°C po dobu dvou hodin. Rostliny testované po první mikropropagaci nebyly ozdraveny, kdežto po druhé mikropropagaci byla úspěšnost v produkci viruprostého materiálu 75 %. Šest z osmi skupin česneku použitých v experimentu bylo negativních na přítomnost virů OYDV, LYSV, GCLV, SLV, MbFV a viry česneku A, B, C a D. Pro detekci virových patogenů byly použity metody ELISA, RT-PCR a elektronová mikroskopie.

Conci a kol. (2005) kultivovali izolované meristémy argentinských odrůd česneku s jedním primordiem (0,3 mm) na médiu D1 (Conci a kol., 1986) při úspěšnosti regenerace 80-90 %. Procento ozdravení bylo závislé na viru a na jednotlivých genotypch česneku. Celkově bylo kultivováno 11 odrůd a detekována byla přítomnost OYDV, LYSV, GCLV, SLV, a GarMbFV. Jako nejlépe eliminovatelné byly vyhodnoceny viry OYDV a LYSV (až 100 %).

Senula a kol. (2000) izolovali apikální meristémy s jedním primordiem o velikosti 0,3 až 0,8 mm z česneku pocházejícího z genové banky v Gaterslebenu (Německo). Meristémy byly kultivovány na MS médiu s vitamíny podle Moricony a kol. (1990). Metodou ELISA bylo testováno 631 rostlin a byly sledovány viry OYDV, LYSV, GCLV, SLV a MbFV. Průměrně bylo ozdraveno 37,7 % rostlin první rok a 26,6 % rostlin druhý rok. Nejčastěji se vyskytujícím virem u pozitivních vzorků byl GCLV, kolem 50 %. Ostatní viry byly eliminovány ve vysokém procentu (OYDV se u pozitivních izolátů vyskytoval průměrně v 5 až 13 %, LYSV v 7 až 12 %). Výsledky byly potvrzeny metodou imuno-elektronové mikroskopie. Při výzkumu bylo také zjištěno, že meristémy o velikosti kolem 1 mm se dvěma až třemi primordii regenerovaly a rostly daleko lépe (v 90-100 %) oproti menším explantátům.

Bruna (1997) izolovala meristémy česneku chilského kultivaru 'Rosado-INIA' o velikosti 0,5 až 0,8 mm, které byly dále kultivovány na médiu obsahujícím makroprvky Gamborg 5 média a mikroprvky a vitamíny MS média. Za tři měsíce byly rostliny převedeny do skleníku a metodou ELISA byl detekován vir OYDV. Ošetření bylo efektivní, podařilo se získat 65 % zdravých rostlin.

Sidaros a kol., (2004) vyhodnotili jako nejlepší médium pro regeneraci a životaschopnost izolovaných meristémů MS médium s přidavkem 0,5 mg.l<sup>-1</sup> BA. Jejich výzkum byl zaměřen také na velikost excitovaných meristémů. Meristémy odrůd 'Chinese', 'Italien' a 'Balady' byly kultivovány ve velikostech 1, 3, a 5 mm. Jako nejoptimálnější byla vyhodnocena varianta 3 mm. Nejlepší regenerace byla u jedinců



velikosti 5 mm, eliminace virů však při této velikosti nebyla efektivní. Produkce viruprostých rostlin byla nejefektivnější (33,3 %) u odrůdy 'Chinese' a velikosti explantátů 3 mm.

### 3.5.2 Chemoterapie

Principem chemoterapie je použití speciálních látek polysacharidové nebo bílkovinné povahy – antivirotik, které zasahují do rozmnožování nukleových kyselin virů a tím zastavují nebo omezují jejich replikaci. V praxi jsou například využívány nebo testovány látky **ribavirin** (Ramírez-Malagón a kol., 2006; Ciešlínska, 2007; Křižan a kol., 2013), **acyclovir** (Weiland a kol., 2004; Navacchi, 2005), **zidovudine**, 2, 4-dioxohexahydro-1, 2, 5-triazine (**DHT**) (Sanjeev a kol., 2007), **amantadine** (Horst and Cohen, 1980; Phillips, 1990), **azacytidine**, **dicyanamide** (Pupola a kol., 2009), **guanazolo**, **adenine analogue**, **hypoxanthine analogues** (Matthews, 1953), **6-azauracil** (1,2,4-triazine-3,5-dione), **vidarbine** (adenine arabinoside), **quanidine** (aminomethanamidine) (Phillips, 1990). Antivirové látky mohou být použity ve fázi předpůsobení na rostlinu, izolovaný růstový vrchol nebo aplikací do kultivačních médií (Novák, 1990). Nevýhodou chemoterapie u česneku může být dle Rabinowitch, Currah (2002) možnost způsobení mutací v kultivovaných tkáních, a tudíž změna zemědělských vlastností česneku. Použití chemoterapie ke snížení replikace virů není doporučováno u experimentů prováděných ve volné půdě.

#### 3.5.2.1 Ribavirin (Virazole)

Chemicky se jedná o 1-((2R,3R,4S,5R) -3, 4 - dihydroxy - 5 - (hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl) - 1H - 1,2,4 - triazole - 3 - ekarboxamid)

Ribavirin je nejčastěji využívané antivirotikum pro eliminaci rostlinných virů. Jedná se o syntetickou látku, strukturálně podobnou guaninu, nevyskytující se v přírodě. V roce 1972 byly poprvé publikovány výzkumy o jeho schopnosti inhibovat replikaci širokého spektra RNA a DNA virů z různých čeledí (Sidwell a kol., 1972). Spektrum aktivity ribavirinu zahrnuje léčbu respiračních onemocnění a chřipky, spalniček, herpes virů, hepatitidy C a hemoragické horečky.

Antivirotický účinek ribavirinu (aktivní forma je ribavirin trifosfát) spočívá v inhibici virové polymerázy, celkem je ale předpokládáno pět různých účinků vysvětlujících vlastnosti ribavirinu. Mezi přímé účinky patří inhibice polymerázy a letální mutagenese, mezi nepřímé potom inhibice inosine monofosfát dehydrogenázy a různé imunomodulační efekty (Meštrović, 2015).

### 3.5.2.2 Acyclovir (syn. Aciclovir, Acycloguanosine, ACV)

Chemický název dle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) je 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6,9-dihydro-3H-purin-6-one (DrugBank, 2015a)

Acyclovir je na světě nejrozšířenější předepisovaný antivirotický lék patřící do skupiny syntetických nukleosidových analogů (Larsen, 2015). Byl objeven v sedmdesátých letech 20. století a poprvé byl předepsán v roce 1983. Základem pro syntézu acycloviru byla mořská houba *Cryptotethya crypta* (Laport a kol., 2009). Acyclovir je primárně používán pro léčbu herpes simplex, první dny je podáván při pásovém oparu a také při opakujících se infekcích genitálních oparů, dále pro léčbu planých neštovic. Je prodáván pod obchodními názvy např. Zovirax, Zoral, Acivir (Larsen, 2015).

Acyclovir je inhibitor virové polymerázy (Gnann a kol., 1983). K aktivaci acycloviru je nutná jeho přeměna na acyclovir monofosfát za pomoci virem kódovaného enzymu thymidine kinase (TK). Tento krok neprobíhá u zdravých buněk, což acycloviru dodává jeho specifčnost. Acyclovir monofosfát je dále přeměněn na aktivní trifosfát formu pomocí buněčných enzymů.

### 3.5.2.3 Rimantadin (Rimantadine, Rimantadine Hydrochloride)

Název dle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) je 1-(adamantan-1-yl)ethan-1-amine (DrugBang, 2015b)

Rimantadin je inhibitor RNA syntézy, který je používán jako antivirotická droga pro léčbu chřipky A. Jeho obchodní název je též Flumadine. Objeven byl v roce 1963, jako lék byl schválen v roce 1994. Jedná se o syntetickou látku řazenou do skupiny cyklických aminů. Přesný mechanismus účinku rimantadinu není plně znám. Jeho účinek je předpokládán v inhibici replikačního cyklu viru nebo případně v inhibici

tvorby kapsidu (coat proteinu) viru (DrugBank, 2015b). Podle dalšího zdroje působí na proteinový kanál chřipkových virů, čímž znemožňuje jejich replikaci (Velký lékařský slovník, 2008).

#### 3.5.2.4 Zidovudin (zidovudine, azidothymidine)

Název dle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC) je 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-2,4-dione (DrugBank, 2015c)

Zidovudin je typ antiretrovirální drogy používaný k léčbě HIV/AIDS infekce. Pod obchodním názvem znám též jako Retrovir. Byl prvním lékem, který signifikantně redukoval replikaci viru (Wright, 1986). Zidovudin virovou replikaci zpomalí, ale úplně nezastavuje (Jeffries, 1989). Inhibuje enzym reverzní transkriptázu.

Zidovudin je syntetický analog pyrimidinu známý jako inhibitor retrovirů u savců, ale v oblasti eliminace rostlinných virů nebyl více zkoumán (Ram a kol., 2005).

Zidovudin je v těle konvertován na aktivní formu zidovudin trifosfát. Takto aktivní forma je podobná složce thymidin trifosfát, kterou potřebuje vir HIV k tvorbě nové DNA. Při reverzní transkripci je místo thymidin trifosfátu využita právě aktivní forma zidovudin trifosfát (DrugBank, 2015c).

#### 3.5.2.5 Praktické využití antivirotik pro eliminaci virových patogenů u rostlin

Křížan a kol. (2010) uvádějí, že úspěšnost eliminace virů u odrůd česneku je při ozdravení metodou meristémových kultur v rozmezí 25 až 45 %, kdežto při použití chemoterapie s **ribavirinem** ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a následné izolaci meristému v rozmezí 47 až 89 %.

Ramírez-Malagón a kol. (2006) použili pro chemoterapii u česneku **ribavirin** v koncentraci  $205 \mu\text{M}$ . Aplikovali jej do média určeného pro kultivaci meristémů izolovaných z česnekových stroužků odrůd 'Taiwan' a 'Chileno'. Přestože ošetření přežilo všech 5000 rostlin, nebyla metoda pro obě ozdravované odrůdy příliš efektivní (27 % a 34,8 % viruprostých rostlin).

Senula a kol. (2000) kultivovali meristémy česneků z genové banky v Gatersleбену na médiu s přísávkem **ribavirinu** v množství 50 mg.l<sup>-1</sup> a 100 mg.l<sup>-1</sup>. Na tomto médiu byly meristémy kultivovány 6 týdnů při 25°C. Ribavirin redukoval regeneraci rostlin, nicméně eliminaci virů hodnotí autoři jako efektivní. Aplikace 50 mg.l<sup>-1</sup> ribavirinu do média zvýšila počet viruprostých rostlin průměrně až o 50 %. Viry GCLV a SLV byly významně redukovány. GCLV poklesl z 66,5 % ke 22,2 % a SLV z 23,7 % ke 2,8 %. U OYDV, LYSV a MbFV nebyl pokles viru významný. Použitím 100 mg.l<sup>-1</sup> ribavirinu bylo dosaženo 100% viruprostých jedinců, rostliny byly ale díky působení ribavirinu hyperhydratované a pro další kultivaci již nepoužitelné.

Sidaros a kol. (2004) ošetřili chemoterapií s použitím **ribavirinu** odrůdy česneku 'Chinese', a 'Balady'. Prvních 10 dní byly kultivovány vrcholové meristémy o velikosti 3 mm na médiu bez ribavirinu, následovala kultivace na médiu s ribavirinem v množství 50 mg.l<sup>-1</sup> po dobu 6 týdnů. Následně byly opět izolovány růstové vrcholy o velikosti 0,1 až 0,2 cm. Ošetření ribavirinem přežilo všech 20 jedinců z každé odrůdy a následnou inokulací na *Ch. amaranticolor* a bylo potvrzeno 100 % ozdravených jedinců.

Fletcher a kol. (1998) eliminovali viry OYDV a SLV pomocí **ribavirinu** v kombinaci s termoterapií u dvou odrůd šalotky. Ribavirin byl aplikován do média v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup>. Rostliny (resp. bazální diskové segmenty) byly kultivovány při relativně vysoké teplotě (35 °C světlo/31 °C tma) a pouze 4 hodiny ve tmě. Po přírůstku do 2 až 3 cm byly růstové vrcholy odstraněny a kultivovány již na médiu bez ribavirinu a při běžném světelném režimu a teplotě 24 °C. Ošetřením bylo získáno 60 % a 62 % rostlin negativních na přítomnost sledovaných virů.

Guta a kol. (2011) použili pro eliminaci virů GVA a GLRaV-1 u révy **ribavirin** v koncentraci 80 μmol.l<sup>-1</sup>. Doba působení byla 30, 60 nebo 90 dní. Chemoterapií byly ošetřeny axilární pupeny a apikální vrcholy. U obou variant nebyl zjištěn negativní vliv na vitalitu rostlin, fytotoxicita se projevila až při testování koncentrace 120 μmol.l<sup>-1</sup>. V případě GVA bylo při době působení 60 dní dosaženo 33 % zdravých rostlin založených z vrcholových meristémů a 100 % zdravých rostlin z axilárních pupenů při době působení 30 dní. GLRaV byl eliminován pouze u rostlin založených z axilárních pupenů a při 30 denním působení ribavirinu (11 %). Viry byly detekovány metodou ELISA.

Danci a kol. (2012) zkoumali vliv **ribavirinu** a jeho koncentrace (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg.l<sup>-1</sup>) na redukci virů u bramboru (PVS: *Potato virus S*, PVY: *Potato virus Y*, PVX: *Potato virus X*, PLRV: *Potato leaf roll virus*). Po 6 až 8 týdnech byly vzorky testovány metodou ELISA. Vyšší koncentrace ribavirinu způsobovaly fytotoxicitu, ale použití koncentrace 35 mg.l<sup>-1</sup> bylo pro eliminaci virů efektivní a nemělo negativní vliv na rostliny. Stevenson a Monette (1983) také pozorovali fytotoxicitu ribavirinu při použití koncentrace 40 až 50 mg.l<sup>-1</sup> u rostlin révy.

Faccioli a Colalongo (2002) aplikovali jako chemoterapii pro eliminaci virů *Potato virus Y* a *Potato leafroll virus* 100 mg.l<sup>-1</sup> **DHT** a 50 mg.l<sup>-1</sup> **ribavirinu**. Po čtyřech týdnech působení byly rostliny testovány metodou ELISA, ale ošetření nebylo efektivní. Nicméně při osmitýdenním ošetření chemoterapií bylo dosaženo až 50 % viru prostých rostlin. Statisticky průkazný vliv na úspěšnost eliminace byl mezi jednotlivými odrůdami.

Weiland a kol. (2004) použili pro eliminaci *Grapevine fanleaf virus* u odrůdy révy 'Zalema' **acyclovir** nebo **ribavirin** v koncentracích 20 mg.l<sup>-1</sup>. Eliminace viru pomocí ribavirinu byla efektivní, detekci po chemoterapii bylo zjištěno (metodou ELISA) 94 % viru prostých jedinců a nebylo pozorováno žádné poškození rostlin. V průběhu kultivace byl pozorován pouze zvýšený výskyt žloutnutí. Naproti tomu ošetření acyclovirem efektivní nebylo a růst stonků a následné kořenění byly ošetřením negativně ovlivněn. Při kultivaci byl také pozorován výskyt apikálních nekrot. Obě chemikálie neměly vliv na hyperhydrataci rostlin.

Navacchi a kol. (2005) použili **acyclovir** a **ribavirin** v kombinaci s termoterapií a metodou meristémových kultur pro eliminaci virů u pěti odrůd artyčoku. Rostliny byly nejprve kultivovány 20 dní při teplotě 38/34°C, poté byly izolovány meristémy o velikosti 0,3-0,5 mm a dále kultivovány na médiu s ribavirinem (20 mg.l<sup>-1</sup>) a acyclovirem (50 mg.l<sup>-1</sup>). Po 90 dnech byly rostliny testovány metodou rostlinných indikátorů. I přes kombinaci všech metod nebyl získán téměř žádný zdravý rostlinný materiál a eliminace virů u artyčoku byla vyhodnocena jako velmi obtížná.

Pupola a kol. (2009) testovali látky **ribavirin** (30 mg.l<sup>-1</sup>), **azacytidine** a **dicyanamide** (25 mg.l<sup>-1</sup>) pro eliminaci viru *Raspberry bushy dwarf idaeovirus* (RBDV)

u rostlin maliníku, kde byl vir neúspěšně eliminován metodou meristémových kultur. Po prvním testování bylo sice dosaženo viruprostých rostlin, avšak při testování rostlin po páté subkultivaci, byl RBDV v rostlinách opět detekován. Následná chemoterapie byla provedena aplikací antivirotik do média pro multiplikaci a rostliny byly na tomto médiu ponechány 25 dní. Po ošetření ribavirinem byl pozorován prokazatelně vyšší výskyt nektróz oproti kontrolní variantě i proti dalším variantám ošetření a eliminace viru nebyla efektivní. Jako úspěšné bylo hodnoceno pouze ošetření azacytidinem a dicyanamidem u jednoho ze tří testovaných souborů rostlin.

Caner a kol. (1985) in Ram a kol. (2004) sledovali inhibiční efekt **acycloviru** na vir *Bean golden mosaic virus* infikující *Phaseolus lunatus*. Žádný efekt **acycloviru** na eliminaci rostlinných virů naopak ve svých pracích popisují Park a kol. (1994) u viru *Potato virus S* a Vcelar a kol. (1992) u viru *Ornithogalum mosaic potyvirus*.

Kolektiv autorů Ram (2005) použili pro eliminaci viru *Chrysanthemum B carlavirus* (CVB) metodu meristémových kultur a chemoterapii za použití látek **acyclovir**, **zidovudin**, **amantadind**, **5-bromouracil** a **2-thiouracil** v koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 mg.l<sup>-1</sup>. Chemoterapií byly rostliny ošetřeny až ve fázi kořenění *in vitro* aplikací do kořenícího média. Nejvíce efektivní bylo ošetření 2-thiouracilem v koncentraci 40 mg.l<sup>-1</sup>. Bylo dosaženo 40 %, resp. 26,7 % negativních rostlin (detekce metodami ELISA a RT-PCR). Ošetřením acyclovirem (30 mg.l<sup>-1</sup>), amantadinem (40 mg.l<sup>-1</sup>) a zidovudinem (35 mg.l<sup>-1</sup>) bylo dosaženo 20 až 30 %, resp. 10 až 20 % rostlin negativních na přítomnost viru. Při použití vyšších koncentrací byla pozorována fytotoxicita a rostliny do třech týdnů odumíraly.

Sanjeev a kol. (2007) eliminovali *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV) v citrusu Kinnow (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) za použití chemikálií **acyclovir** (acycloguanosine), **zidovudin** (azidothymidine), **DHT**, **ribavirin** a **2-thiouracil** v koncentracích (5 až 25 mg.l<sup>-1</sup>). Antivirotika byla aplikována do média pro kultivaci nodálních segmentů. Maximum (37 %) viru prostých rostlin bylo získáno aplikací ribavirinu v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup>, následoval 2-thiouracil v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup>

(21,4 %) a acyclovir v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (20,8 %). Ošetření zidovudinem a DHT nebylo efektivní. V případě koncentrace zidovudinu 25 mg.l<sup>-1</sup> bylo po testování metodou ELISA 11,11 % vzorků viru prostých, test RT-PCR to ovšem vyvrátil.

### **3.5.3 Termoterapie**

Při termoterapii jsou rostliny podrobeny působení zvýšených teplot. Při teplotách nad 38 °C je množení virů v rostlinných buňkách redukováno nebo zcela zastaveno. Zároveň rostlinné meristemické buňky pokračují v dělení a replikaci spíše pomaleji. Může ovšem dojít také ke zpomalení růstu rostliny a k somatickým mutacím (Novák, 1990; Rabinowitch, Currah, 2002). Spojením meristémové kultury s termoterapií je šance na regeneraci a vznik viruprostého materiálu zvýšena (Bertaccini a kol. (2004; Conci a kol., 2005). Na pracovišti Mendeleum bylo v předešlých projektech potvrzeno, že termoterapie pro eliminaci virů u česneku je dražší a méně efektivní než například chemoterapie s použitím antivirotika ribavirin (Křížan a kol., 2013).

### **3.5.4 Kryoterapie**

Kryoterapie využívá kryoprezervační procedury (uskladnění v kapalném dusíku při -196°C) jako zákrok, který selektivně zlikviduje infikovaná rostlinná pletiva a ponechá jen zdravý apikální meristém (tzv. „cryoknive“). Meristemické buňky jsou nejodolnější ke kryoprezervačním postupům, protože jsou méně hydratované. Princip je shodný s metodou meristémových kultur. Nevýhodou je nutná přítomnost zdravého pletiva (meristému) (Brison a kol., 1997; Wang a kol., 2006).

### **3.5.5 Elektroterapie**

Některé publikace uvádějí jako možnou metodu pro eliminaci virů také elektroterapii (AlMaari a kol., 2012; Hormozi-Nejad a kol., 2010; Bayati a kol., 2011). Části rostlin jsou při tomto postupu umístěny do vaničky na elektroforézu se sterilním roztokem chloridu sodného a následně je spuštěn elektrický proud. Po tomto kroku obvykle následuje izolace meristému.

### 3.5.6 Silice

V posledních letech jsou pro eliminaci fytovirů zkoumány účinky rostlinných silic. Jedná se například o silice rodu *Teucrium* (Bezić a kol., 2011), druhů rodu *Lamiaceae* (Bezić a kol., 2013), *Satureja montana* L. ssp. *Variegata* (Dunkić a kol., 2010), *Melaleuca alternifolia* (Bishop, 1995), *Plectranthus tenuiflorus* (Othman a Shoman, 2004).



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

**První rok** řešení (2011) disertační práce byla chemoterapie aplikována na rostliny česneku, které byly ozdravovány v rámci projektu NAZV QH71228 („Ozdravení domácích genotypů česneku za účelem jejich uchování metodou kryokonzervace“). Tyto rostliny byly kultivovány a multiplikovány v *in vitro* podmínkách v rámci zmíněného projektu, ale metodou meristémových kultur nebyly dle testování metodou ELISA od virových chorob úspěšně ozdraveny. Jednalo se o soubor rostlin staré francouzské odrůdy 'D'Alsace Freres'. Pro experiment byly vybrány rostliny, u kterých byla zjištěna přítomnost sledovaných virů (OYDV, LYSV, SLV, GCLV). Odrůda 'D'Alsace Freres' je paličák s hodně malými pacibulkami. Rostlina je středně silná a má zelené vzpřímené listy. Cibule je kulovitá s vystouplým podpučím a béžovými obalovými suknicemi. Stroužky jsou červené, pravidelně uspořádané v průměrném počtu 5 až 6 ks (Obr. 1). Do genové kolekce v Olomouci byla zařazena v roce 1966.



Obrázek 1 Genotyp česneku 'D'Alsace Freres' (autor fotky: Ing. Stavěliková, Ph.D.)

**Ve druhém roce** (2012) bylo pracováno s odrůdami dodanými Oddělením genové banky VÚRV v.v.i. v Olomouci. Jednalo se o odrůdy 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo'.

Odrůda 'Sukoradský' je polovybíhající do květu, pacibulky má v různých částech pseudostonku. 'Sukoradský' je středně silná rostlina se vzpřímenými zelenými listy,

které mají v průřezu tvar V. Cibule je široce oválná se smetanovými obalovými suknicemi, s 11 až 15 červenými stroužky, které jsou uspořádány pravidelně ve více vějířovitých skupinách (IPGRI ECP/GR, AVRDC 2001).

Ozimý paličák odrůdy 'Blanin' má cibule středně velké, barva vnějších suknic je šedobílá s nevýraznými fialovými skvrnami. Uspořádání stroužků v cibuli je nepravidelné, jsou středně velké v počtu 6 až 12. Listy jsou krátké, polovzpřímené, tmavě zelené. Odrůda dává střední výnosy, hmotnost cibule je střední, skladovatelnost velmi vysoká (Kozák, 2015). Díky pozdnímu rašení není tato odrůda napadána houbomilkou česnekovou. V současné době je povolena odrůda 'Blanin II' (Věstník ÚKZÚZ, 2015).

'Japo' je jarní úzkolistý nepaličák. Cibule jsou kulovité, velké, bílé, pravidelného tvaru. Stroužky jsou uspořádány nepravidelně v počtu 8 až 13. Listy jsou středně dlouhé, vzpřímené, sytě zelené, rostliny jsou mohutné. 'Japo' je velmi výnosná pozdní odrůda (sklizeň až začátkem srpna) s velmi vysokou skladovatelností (Kozák, 2015). V současné době je povolena odrůda 'Japo II' (Věstník ÚKZÚZ, 2015).

**Třetí a čtvrtý rok** (2013 a 2014) byly pro experiment vybrány genotypy česneku 'Unikát' a 'Dukát' pocházející z firmy Moravoseed CZ a.s. Z důvodu mikrobiálních infekcí ale nebyl genotyp 'Dukát' úspěšně převeden do aseptických podmínek ani v jednom roce a v práci není hodnocen.

'Unikát' (Obr. 2) je genotyp ozimého paličáku s hmotností cibule v rozmezí 75 až 85 g. Barva vnějších suknic je šedá, barva stroužků fialová. Počet středně velkých stroužků v cibuli je 8 až 13. Genotyp je popisován jako velmi dobře skladovatelný a dobře přezimuje.



Obrázek 2 Genotyp česneku 'Unikat'

#### 4.2 Živné půdy (médiá)

Jako základní živná půda bylo použito médium Murashige a Skoog (1962), dále MS. Antivirotika byla aplikována do živných půd po sterilizaci v autoklávu. Byly použity čtyři obměny MS média – kontrolní varianta (C0), dva způsoby aplikace chemoterapie (CA a CB) a médium pro následnou kultivaci (C1).

##### a) Příprava média – kontrolní varianta (C0)

V destilované vodě byl nejprve rozvařen agar (Plantagar S 1000, B&V srl, Parma, Itálie) v množství 6 g na litr média. Pro přípravu MS média bylo použito směsi Murashige&Skoog medium Including Vitamins (Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemsko) v množství  $4,40519 \text{ g.l}^{-1}$ , dále byla přidána sacharóza (30 g na litr média), myo-inozitol (0,1 g na litr média) a 1 ml širokospektrálního antibiotika (ProClin 200, SUPELCO Analytical, USA). Při zakládání primárních kultur z podzemních orgánů rostlin je antibiotikum v počáteční fázi vhodnou složkou média. Nakonec bylo médium doplněno do jednoho litru destilovanou vodou a upraveno na pH 6. Takto připravené médium bylo dávkováno do širokhrdlých zkumavek (Obr. 3a), uzavřeno víčkem a autoklávováno.

##### b) Příprava média CA – chemoterapie (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50)

Postup přípravy média pro chemoterapii byl stejný jako u kontrolní varianty s tím rozdílem, že médium bylo autoklávováno v jednolitrových Erlenmeyerových baňkách.

Po sterilizaci bylo do média přidáno antivirotikum pomocí sterilního filtru s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  a následně dávkováno do širokohrdých zkumavek. Prázdné zkumavky byly před plněním uzavřeny a autoklávovány. Dávkování antivirotika a následné dávkování média do zkumavek probíhalo v laminárním boxu.

c) Příprava média CB – chemoterapie (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50)

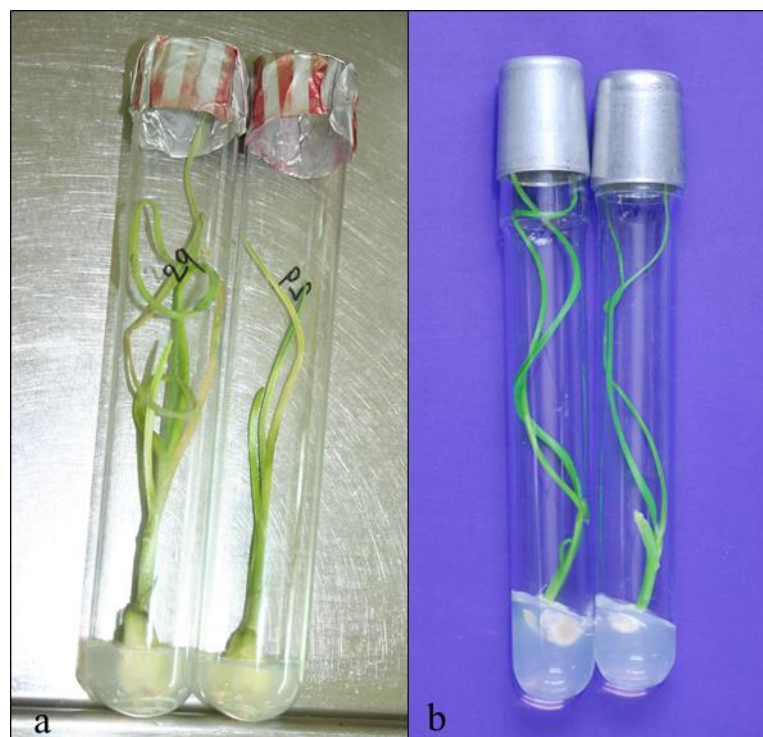
Stejným postupem, jakým bylo připraveno médium CA, bylo připraveno médium CB. Médium ještě navíc obohaceno o 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  BA, 0,1  $\text{mg.l}^{-1}$  NAA a 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  GA3 a ProClin 200 již přidán nebyl. Médium bylo poté dávkováno do úzkohrdých zkumavek.

d) Příprava média C1 – následná kultivace

Postup přípravy byl stejný jako u kontrolní varianty, ale médium bylo obohaceno o rostlinné regulátory 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  BA (benzyladenin), 0,1  $\text{mg.l}^{-1}$  NAA ( $\alpha$ -naftyloctová kyselina) a 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  GA3 (kyselina gibberelová). ProClin 200 byl do média přidáván na začátku kultivace meristémů nebo pouze v případě výskytu bakteriálních infekcí. Po přípravě bylo médium dávkováno do úzkohrdých zkumavek (Obr. 3b), uzavřeno a autoklávováno.

#### 4.3 Převod rostlin do aseptických podmínek

Převod rostlin do aseptických podmínek probíhal od listopadu do března. Cibule česneku byly děleny na jednotlivé stroužky, které byly následně zbaveny obalových šupin. Takto připravené stroužky byly ošetřeny vlažnou vodou se smáčedlem (Jar) a v aseptickém prostředí laminárního boxu povrchově desinfikovány 0,2% chloridem rtuťnatým po dobu 13 minut. Následovalo třikrát opakované promývání stroužků ve sterilní destilované vodě.



Obrázek 3 Širokohrdlé (a) a úzkohrdlé (b) zkumavky pro *in vitro* kultivaci česneku

#### 4.4 Chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou

Látky acyclovir, rimantadin a zidovudin byly zvoleny jako antivirotika pro chemoterapii a byly aplikovány do živných púd. Pozorováno bylo celkem šest variant chemoterapie ve třech způsobech působení antivirotik plus kontrolní varianta. Koncentrace antivirotik v jednotlivých variantách byla následující:

A25 – acyclovir v množství  $25 \text{ mg.l}^{-1}$

A50 – acyclovir v množství  $50 \text{ mg.l}^{-1}$

R25 – rimantadin v množství  $25 \text{ mg.l}^{-1}$

R50 – rimantadin v množství  $50 \text{ mg.l}^{-1}$

Z25 – zidovudin v množství  $25 \text{ mg.l}^{-1}$

Z50 – zidovudin v množství  $50 \text{ mg.l}^{-1}$

#### Působení antivirotik na mladé rostliny neúspěšně ozdravené meristémovou kulturou

V prvním roce experimentu, kdy byly použity mladé rostliny česneku odrůdy 'D'Alsace Freres' v *in vitro* kultuře již jednou ozdravované, nebyly izolovány

meristémy. Rostlinám byly při pasážování pouze zakráčeny listové čepele, případně kořeny (Obr. 4) a rostliny byly umístěny po dobu dvou týdnů na médium CB s antivirotiky (varianty A25, A50, R25, R50, Z25 nebo Z50). Následovala kultivace rostlin na C1 médiu bez antivirotik. Při další subkultivaci (za 6 týdnů) byly odebrané listové čepele testovány metodou ELISA. Celkem bylo na přítomnost virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV otestováno 84 rostlin, každá varianta obsahovala 14 rostlin.

### **Působení antivirotik na izolované růstové vrcholy**

Tato varianta byla použita ve druhém roce experimentu u odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo'. U této varianty byla antivirotika aplikována do média C1 (tzn. CB médium), tzn. jednalo se o působení antivirotik na izolované růstové vrcholy. Povrchově dezinfikované stroužky byly nejprve ve sterilním prostředí laminárního boxu převedeny na připravená média (C0) a průběžně byly vytřízeny infekce. Během prorůstání stroužků v *in vitro* kultuře byly odebírány listové čepele stroužků, které byly následně testovány na přítomnost sledovaných virů (OYDV, LYSV, SLV a GCLV). Testován byl vždy jeden stroužek z cibule. U prvních deseti cibulí byly otestovány stroužky všechny. Jelikož byla přítomnost virů u všech stroužků v rámci jedné cibule shodná, byl následně testován pouze jeden stroužek z cibule. Tento způsob byl zvolen také z hlediska finančního.

Po dvou až třech týdnech (po nárůstu listových čepelí min. 3 cm) následovala izolace meristémů s ponecháním jednoho listového primordia (0,8 mm). Izolace růstových vrcholů byla prováděna za pomoci binokulární lupy, skalpele a pinzety. Růstové vrcholy byly dále dva týdny kultivovány na médiích CB s antivirotiky (varianty A25, A50, R25, R50, Z25 nebo Z50). Následovala kultivace na médiu C1 bez antivirotik. Zpočátku každé čtyři týdny, později každých šest týdnů, byly mladé rostliny pasážovány na nové médium.

### **Působení antivirotik na stroužky**

Tato varianta bylo použita ve třetím a čtvrtém roce u odrůdy 'Unikát'. Povrchově dezinfikované stroužky byly ve sterilním prostředí laminárního boxu převedeny na připravená média CA s antivirotiky (varianty A25, A50, R25, R50, Z25 nebo Z50) nebo bez antivirotik (kontrolní varianta).

Během prorůstání stroužků v *in vitro* kultuře byly odebírány listové čepele stroužků z kontrolní varianty, které byly následně testovány na přítomnost sledovaných virů (OYDV, LYSV, SLV a GCLV). Testován byl vždy jeden stroužek z cibule. U prvních deseti cibulí byly otestovány stroužky všechny. Jelikož byla přítomnost virů u všech stroužků v rámci jedné cibule shodná, byl následně testován pouze jeden stroužek z cibule. Tento způsob byl zvolen také z hlediska finančního.

Doba působení antivirotik byla dva týdny, poté následovala izolace meristémů s ponecháním jednoho listového primordia (0,8 mm). Izolace meristémů byla prováděna za pomoci binokulární lupy, skalpele a pinzety. Následovala kultivace meristémů na MS médiu s přidavkem rostlinných regulátorů bez antivirotik (C1). Zpočátku každé čtyři týdny, později každých šest týdnů, byly mladé rostliny pasážovány na nové médium.



**Obrázek 4 Působení antivirotik na mladé rostliny česneku neúspěšně ozdravené meristémovou kulturou**

#### 4.5 Kontrolní varianta

Jako kontrolní varianta byla zvolena prostá izolace meristému (meristémová kultura). Prakticky se ovšem jedná o izolované růstové vrcholy, protože meristémy byly odebírány s ponecháním jednoho listového primordia a velikostí 0,8 mm. Připravené, povrchově dezinfikované stroužky byly ve sterilním prostředí laminárního boxu umístěny na živnou půdu bez antivirotik (C0 médium). Stroužky byly takto kultivovány dva týdny. Následně byly odebírány růstové vrcholy. Další kultivace probíhala na MS médiu s přidavkem rostlinných regulátorů bez antivirotik (C1). Zpočátku každé čtyři týdny, později každých šest týdnů, byly mladé explantáty pasážovány na nové médium.

V prvním roce experimentu byly hodnoceny pouze jednotlivé varianty chemoterapie bez kontroly.



**Obrázek 5** Izolovaný růstový vrchol (meristém s ponecháním jednoho až dvou základů listů). Foto: Ing. Naušová

#### 4.6 Kultivační podmínky

Experiment byl lokalizován v *in vitro* laboratoři Mendeleum - ústavu genetiky, ZF MENDELU v Lednici. Celá kultivace rostlin probíhala při teplotě  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. K osvětlení byly použity zářivkové trubice s intenzitou  $20,25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .



## 4.7 První rok experimentu

### 4.7.1 Působení antivirotik na mladé rostliny neúspěšně ozdravené meristémovou kulturou

Pro ošetření chemoterapií byly první rok experimentu použity rostliny česneku odrůdy 'D'Alsace Freres' infikované komplexem virových patogenů, které byly v minulosti neúspěšně ozdravovány za pomoci meristémových kultur. Rostliny byly po celou dobu kultivovány a multiplikovány na C1 médiu. Pro chemoterapii byla připravena média s obsahem antivirotik a růstových regulátorů (CB) a rostliny byly na těchto médiích kultivovány dva týdny. Poté byly pasážovány opět na C1 médiu. Po aplikaci chemoterapie s využitím nových antivirotik byly rostliny přetestovány metodou ELISA (na pracovišti Mendeleum pro česnek zavedena a použita v projektu NAZV QH71228) a výsledky byly vyhodnoceny samostatně. Metoda ELISA byla použita pouze v prvním roce experimentu.

### 4.7.2 Detekce virů metodou ELISA

Testování bylo provedeno podle metodiky firmy Bioreba (Reinach, Švýcarsko). Listové čepele česneku kultivovaného *in vitro* (navážka min. 0,25 g) byly homogenizovány poloautomatickým homogenizérem a k testování byly použity sady testovacích sér (IgG + konjugát) pro jednotlivé viry a lyofilizované pozitivní a negativní kontroly od firmy Bioreba. Absorbance byla měřena při 405 nm.

#### Potažení destiček protilátkami

Plastové destičky, na nichž bylo testováno, byly potaženy potahovacím pufrem. Jedna destička sloužila k otestování 10 rostlin na všechny čtyři viry. Pufr byl vyroben tak, že v 1000 ml destilované vody bylo rozpuštěno 1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$  + 0,2 g  $\text{NaN}_3$  a jeho pH bylo upraveno na 9,6 (pH je upravováno přídatkem NaOH nebo HCl). Roztok byl namíchán dopředu, protože jej lze uchovávat až jeden týden při teplotě 4 °C. Na jednu destičku bylo potřeba 20 ml tohoto roztoku. IgG (imunoglobuliny třídy G) byl ředěn potahovacím pufrem dle návodu dodavatele

(1000krát). Do každé jamky v destičce (i na blank) bylo napipetováno 200  $\mu$ l. Destičky byly inkubovány přes noc při teplotě 4 °C.

#### Příprava promývacího pufru (PBS) a promývání

V 5 litrech destilované vody bylo rozpuštěno:

40 g	NaCl
14,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 g	KCl
1 g	NaN <sub>3</sub>
2,5 ml	Tween 20

pH tohoto pufru bylo upraveno na 7,4 (přídavkem NaOH nebo HCl). V promývačce (Tecan Columbus Plus, Männedorf, Švýcarsko) byly destičky tímto pufrem promývány třikrát po třech minutách. Poté byly destičky vyjmuty a zbaveny zbytku roztoku oklepáním o filtrační papír. Destičky lze uchovat v mrazáku. PBS lze uchovat týden.

#### Příprava extrakčního pufru

V 500 ml PBS bylo rozpuštěno 1 g polyvinylpyrolidonu (PVP) + 2,5 g albuminu (vaječný, hovězí sérový). Na jednu destičku bylo potřeba 250 ml tohoto pufru. Tento roztok bylo nutno míchat denně čerstvý.

#### Příprava rostlinného materiálu

Odebrané listové čepele (přibližně 0,25 g) v uzavíratelných sáčcích byly zality 5 ml extrakčního pufru; byly homogenizovány a dvě hodiny inkubovány. Do jednotlivých jamek v destičkách bylo nanášeno 200  $\mu$ l tohoto roztoku. Byla zařazena pozitivní a negativní kontrola a slepý vzorek (blank), na který byl nanášen pouze extrakční pufr. Takto připravené destičky byly inkubovány při 4 °C přes noc.

#### Promývání

V promývačce byly destičky promývány PBS pufrem třikrát po třech minutách. Poté byly destičky vyjmuty a zbaveny zbytku roztoku oklepáním o filtrační papír.

#### Protilátky značené enzymem

V 1000 ml PBS bylo rozpuštěno 2 g albuminu + 20 g PVP. Tento roztok se nazývá konjugační pufr a jeho spotřeba na jednu destičku byla 20 ml. Pufr musel být připraven denně čerstvý. V konjugačním pufru byl ředěn konjugát dle návodu dodavatele (1000krát) a pipetován v množství 200  $\mu$ l do každé jamky v destičce. Na konjugát bylo nutné použít zvláštní nádoby nepoužívané na jinou činnost. Inkubace trvala přes noc při 4 °C.

#### Promývání

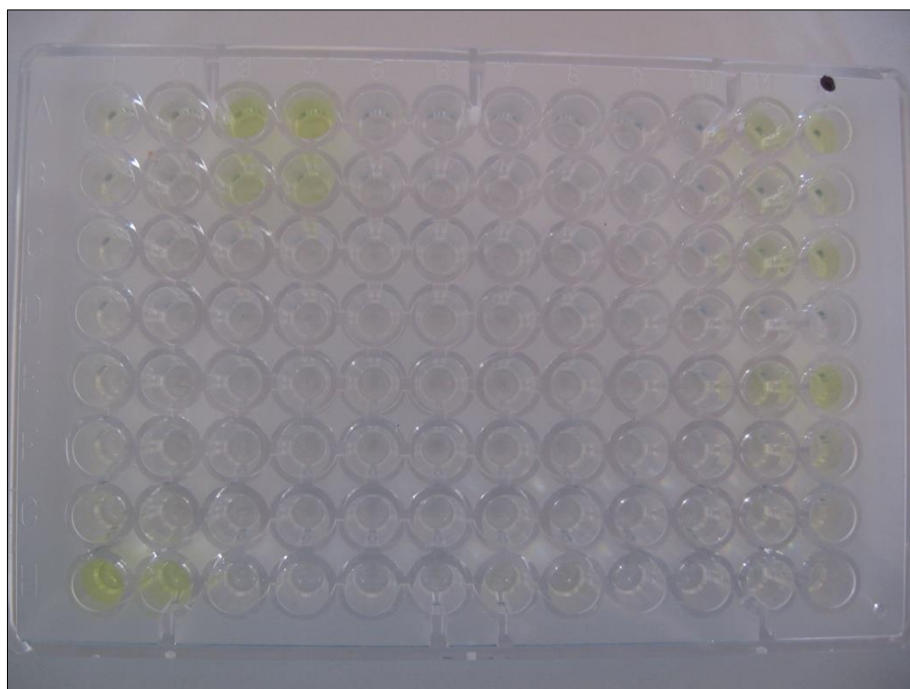
V promývačce byly destičky promývány PBS puftrem pětkrát po třech minutách. Poté byly destičky vyjmuty a zbaveny zbytku roztoku oklepáním o filtrační papír.

#### Enzymatická reakce

V 1000 ml mírně zahřáté destilované vody bylo rozpuštěno 97 ml diethanolaminu + 0,2 g  $\text{NaN}_3$  a pH upraveno na 9,8 (koncentrovanou HCl). Tento roztok je nazýván substrátovým puftrem a je temperovaný. Na jednu destičku je třeba 20 ml tohoto pufru. Pufr lze uchovávat několik týdnů v tmavé lahvi při teplotě 4 °C. Bylo přidáno 0,75 mg p-nitrophenylphosphatu na 1 ml substrátového pufru. Do každé jamky bylo pipetováno 200  $\mu$ l roztoku.

Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 405 nm na spektrofotometru Sunrise (Tecan, Rakousko) a reakce byla vyhodnocována po 60 minutách. Reakci je možné zastavit přidávkem 50  $\mu$ l 3M roztoku KOH do každé jamky.

Jako pozitivní byly hodnoceny izoláty s průměrnou hodnotou absorbance přesahující 0,100 a zároveň překračující průměrnou hodnotu tří negativních izolátů (dle metodiky Bioreba).



Obrázek 6 Výsledná barevná reakce detekce ELISA, žlutá políčka jsou pozitivní

#### 4.7.3 Testování česneku reverzně transkripční polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) a porování s výsledky metody ELISA

Na pracovišti Mendeleum byly molekulární metody úspěšně používány pro detekci virových patogenů u révy vinné a ovocných dřevin, pro česnek tato metoda detekce původně optimalizována nebyla. V rámci disertační práce byla optimalizována tato metoda také pro detekci virů u česneku, především z důvodu vyšší citlivosti metody (Sanjeev a kol., 2007). V prvním roce experimentu bylo testování metodou RT-PCR započato v rámci projektu „Testování rostlin česneku na přítomnost virů metodou RT-PCR po ozdravení chemoterapií“ financovaného Interní grantovou agenturou. Jako rostlinný materiál pro zavedení metody bylo vybráno 100 *in vitro* multiplikovaných rostlin česneku odrůdy 'Lukan', které byly dle výsledků testování metodou ELISA (v rámci zmíněného projektu NAZV) negativní na přítomnost sledovaných virů (OYDV, LYSV, SLV, GCLV). Po úspěšné optimalizaci a detekci virů metodou RT-PCR následovalo u těchto izolátů porovnání obou metod.

#### 4.7.3.1 Oděr rostlinného materiálu a izolace RNA

Pro izolaci RNA byly použity listové čepele rostlin kultivovaných *in vitro*, které byly odebírány při pasážování. Navážka činila 100 mg. Listové čepele byly uloženy do hluboko mrazicího boxu na předem, nejlépe přes noc, vymražené třecí misky s tloučky a mrazeny minimálně jednu hodinu.

Jelikož jsou požadavky na kvalitu izolované RNA poměrně vysoké, je pro izolaci RNA přínosné používat komerční kity. Dodávané kolony s křemičitou membránou specificky zachytávají molekuly RNA. K výhodám patří také eliminace sekundárních metabolitů z rostlinných pletiv (Eichmeier, 2013).

Pro izolaci rostlinné RNA byl použit izolační kit Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dle přiloženého protokolu od výrobce. Při jedné izolaci bylo obvykle pracováno se 16 rostlinami česneku a velmi důležité bylo značení mikrozkuvek v každém kroku, aby nedošlo k záměně izolátů.

Listové čepele vymražené ve třecích miskách byly tloučkem homogenizovány a použity pro izolaci celkové RNA. Těsně před homogenizací listových čepelí bylo do 2 ml mikrozkuvek napipetováno 500  $\mu$ l lytického roztoku a 5  $\mu$ l 2-merkaptoetanolu. Práce s merkaptoetanolem (až do druhého promývání promývacím roztokem 2) probíhala v digestoři. 100 mg dokonale zhomogenizované listové čepele bylo převedeno do těchto mikrozkuvek. Následovalo protřepání směsi na třepačce (30 sekund při 1400 rpm) a inkubace při teplotě 56 °C po dobu 4 minut v termobloku. Následující centrifugační kroky byly prováděny při rychlosti 16000 g.

První odstředění probíhalo po dobu tří minut (do vytvoření pelet z buněčného odpadu). Vzniklý supernatant byl odpipetován do modré filtrační kolony, která byla umístěna ve 2ml sběrné mikrozkuvce, a následovalo odstředění po dobu 1 minuty. Kolony i mikrozkuvky používané od tohoto kroku byly součástí izolačního kitu. Po odstředění byla filtrační kolona odstraněna a do vyčištěného lyzátu bylo napipetováno 500  $\mu$ l vázacího roztoku a směs byla pomocí pipety řádně promíchána.

Pro následující krok byly připraveny nové mikrozkuvky s vázacími kolonami (červené). Na vázací kolonu bylo napipetováno 700  $\mu$ l řádně promíchané směsi.

Následující krok byl 2x po sobě zopakován. Izoláty byly odstředěny po dobu jedné minuty (navázání RNA na membránu červené kolony), tekutina odlita a každá

mikrozkumavka oklepána o čistý savý papír. Poté byly kolony umístěny zpět do mikrozkumavek.

První promývání kolon promývacím roztokem byl další krok izolace. 500  $\mu$ l promývacího roztoku 1 bylo napipetováno na vázací kolonu, na kterou byla v předchozím kroku navázána RNA. Izoláty byly odstředovány 1 minutu, poté byla tekutina z mikrozkumavky odlita a mikrozkumavka byla opět oklepána o čistý savý papír. Kolona byla vrácena do mikrozkumavky a byl přidán zředěný promývací roztok 2 (500  $\mu$ l). Po odstředění (1 minuta) byla tekutina opět vylita a mikrozkumavka oklepána o čistý savý papír. Promývání promývacím roztokem 2 bylo jednou opakováno.

Po promývání následovalo sušení kolony. Mikrozkumavka s kolonou byla minutu centrifugována, aby bylo dosaženo dokonale suché vázací kolony.

Vymývání RNA byl poslední krok izolace. Suchá vázací kolona byla přemístěna do nové mikrozkumavky a bylo přidáno 50  $\mu$ l elučního roztoku přesně na střed vázací matrice na koloně. Po minutové inkubaci při pokojové teplotě následovalo minutové odstředění v centrifuze. Krok byl jednou identicky opakován.

Do vyizolované RNA byl přidán 1  $\mu$ l RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, USA) a to kvůli zamezení degradace RNA při uchovávání RNA na delší dobu.

#### **4.7.3.2 Měření koncentrace RNA fluorometricky**

Koncentrace vyizolované RNA byla měřena fluorometricky kitem Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent (Invitrogen, USA). RNA byla naředěna puftrem 1 $\times$  TE (zásobní roztok 20 $\times$  TE je součástí kitu) v poměru 1:199. Puftrem 1 $\times$  TE byl připraven 200 $\times$  ředěný roztok barviva RiboGreen®. 50  $\mu$ l ředěné RNA bylo smícháno s 50  $\mu$ l ředěného barviva, promícháno a přeneseno do skleněné kyvety. Koncentrace RNA byla měřena flouometricky přístrojem Modulus™ Single Tube Fluorometer 9200-000 (Turner BioSystems, Sunnyvale, USA) při zvoleném modrém filtru. Vlnová délka maxima pro excitaci je 500 nm pro vstupující záření, emisní maximum při navázání fluoroforů na RNA je 525 nm. Koncentrace RNA v neznámých vzorcích byla vyhodnocena na základě extrapolace získaných hodnot fluorescence do kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestrojena ředěním standardního roztoku RNA, který je součástí kitu.

#### 4.7.3.3 Sjednocení koncentrací RNA před reverzní transkripcí

Izoláty RNA byly před reverzní transkripcí sladěny na jednotnou koncentraci. Výtěžek izolací kitem Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma, St. Louis, USA) se pohyboval v rozmezí 50 až 100 ng.μl<sup>-1</sup>. Koncentrace RNA izolátů byla vždy standardizována na 50 ng.μl<sup>-1</sup>. Pokud byla koncentrace izolátů nižší, byla provedena nová izolace RNA (nejdříve však za čtyři týdny od posledního odběru listových čepelí, aby byly rostliny zregenerovány).

#### 4.7.3.4 Reverzní transkripce

Po izolaci RNA následovala reverzní transkripce (RT). Při RT byly izoláty přepsány na cDNA (complementary DNA) za užití enzymu reverzní transkriptázy M-MLV RT (RevertAid™ Reverse Transcriptase; Fermentas, Vilnius, Litva). Prvním krokem RT byla denaturace (5 min 95 °C), vzorek byl tvořen 12 μl HPLC vody, 2 μl celkové RNA a 0,5 μl random primer p(dN)<sub>6</sub> (Roche, Mannheim, Německo). Následovala syntéza cDNA (10 min 25 °C a 1 hod. 42 °C), před kterou bylo do izolátu přidáno 10 μl reakční směsi obsahující 5 μl RT pufru (5x, dodávaný s reverzní transkriptázou, Fermentas); 1,25 μl (10mM) dNTPs (deoxynucleotide triphosphates) (Invitex, Berlin, Německo); 0,5 μl reverzní transkriptázy (200 U/μl, Fermentas), zbytek do 10 μl tvořila HPLC voda.

#### 4.7.3.5 Polymerázová řetězová reakce

2 μl získané cDNA byly použity do polymerázové řetězové reakce (PCR). Celkový objem reakční směsi činil 25 μl a obsahoval: HPLC vodu, 0,5 μl (10mM) dNTPs (Invitex, Berlin, Německo); 0,75 μl (10 μM) každého primeru; 2,5 μl pufru (dodávaného s polymerázou); 0,1 μl 5 U/μl Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, Hitchin, UK). Sekvence primerů pro detekci virů OYDV, LYDV, SLV a GCLV (Tab. 1) byly použity dle publikace Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011). Použité primery byly syntetizovány firmou VBC-Biotech (Wien, Rakousko). Teplotní režim PCR byl zpočátku pro všechny viry stejný: 94 °C 5 min.; následovalo 40 cyklů 94 °C 30 sek., 47 °C 30 sek., 72 °C 45 sek.; po cyklování následovalo 72 °C 7 minut.

**Tabulka 1 Sekvence primerů pro detekci OYDV, LYSV, SLV, GCLV**

Onion yellow dwarf virus	OYDV81F: 5'-TTAGCACGTTACGCATTCTGA-3'
Onion yellow dwarf virus	OYDV81R: 5'-TTACCATCCAGGCCAAACAA-3'
Leek yellow stripe virus	LYSV81-410F: 5'-AAGAACACCAGTTAGAGCGCG-3'
Leek yellow stripe virus	LYSV81-535R: 5'-TGCCTCTCCGTGTCCTCATC-3'
Shallot latent virus	SLV81-569F: 5'-AACAAAGCAGCGATTCAACC -3'
Shallot latent virus	SLV81-730R: 5'-ACATCCGAAGAAACCTCCAGT -3'
Garlic common latent virus	GCLV2F: 5'-CGACCACCTGCTGGTTGG -3'
Garlic common latent virus	GCLV1R: 5'-TCAAGTGGCTGCACACAAGC -3'

#### 4.7.3.6 Vizualizace PCR produktů

Po PCR byly izoláty elektroforeticky separovány na 2% agarózovém gelu. Velikosti výsledných produktů byly následující: OYDV 132 pb; LYSV 126 pb; SLV 160 pb; GCLV 106 pb. Pro přípravu gelu byla použita agaróza (Serva, Heidelberg, Německo) a 1x roztok pufru TAE (TAE 50krát: 2M Tris báze; 2M ledová kyselina octová; 50 mM EDTA; Sambrook a kol., 1989). Pro obarvení izolátů bylo použito barvivo GelRed (Biotium, Hayward, USA), které bylo přidáno do gelu po rozvaření, v dávce 5 µl na 100 ml gelu. Izoláty byly na gel dávkovány spolu se 7 µl nanášecího pufru s 50% glycerolem a barvivem Orange G. Na gel byl přidáván velikostní standard 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Darmstadt, Německo). Elektroforéza byla spuštěna na 100 V po dobu 45 minut až jedné hodiny.

## 4.8 Druhý rok experimentu

### 4.8.1 Detekce virů před aplikací chemoterapie a izolaci meristému

V experimentu bylo pracováno celkem s 74 stroužky česneku odrůdy 'Blanin', které byly děleny z 10 cibulí, s 210 stroužky česneku odrůdy 'Sukoradský', které byly děleny z 18 cibulí a se 100 stroužky česneku odrůdy 'Japo', které byly děleny z 8 cibulí. Každá cibule byla testována na přítomnost virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV před procesem ozdravování metodou RT-PCR. Jako materiál pro zjištění přítomnosti virů v rostlinách česneku sloužily mladé listové čepele.



#### **4.8.2 Chemoterapie: působení antivirotik na izolované růstové vrcholy**

Během října 2011 až února 2012 byly do aseptických podmínek převedeny odrůdy česneku 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo'. Jednotlivé stroužky byly kultivovány na médiu C0 a postupně byly vyříděny infekce (Tab. 7 v kapitole Výsledky). Při velikosti listů minimálně 3 cm byly izolovány růstové vrcholy (0,8 mm). Izolované růstové vrcholy byly dále dva týdny kultivovány na médiu CB s antivirotiky (Působení antivirotik na izolované růstové vrcholy). Explantáty byly následně kultivovány na médiu C1 a každé 4 týdny pasážovány na nové médium.

Celkově bylo izolováno 50 růstových vrcholů odrůdy 'Blanin', které byly kultivovány na médiu CB s antivirotiky. Každá varianta obsahovala 7 rostlin (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50 a kontrola).

Celkově bylo vyizolováno 175 růstových vrcholů odrůdy 'Sukoradský', které byly kultivovány na médiu CB s antivirotiky. Každá varianta obsahovala 25 rostlin (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50 a kontrola).

Celkově bylo vyizolováno 91 růstových vrcholů odrůdy 'Japo', které byly kultivovány na médiu CB s antivirotiky. Každá varianta obsahovala 13 rostlin (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50 a kontrola).

Po dvoutýdenní kultivaci na médiu CB s antivirotiky byly explantáty dále kultivovány na médiu C1 bez antivirotik a následně každé 4 týdny pasážovány.

Každá cibule byla testována na přítomnost virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV před procesem ozdravování metodou RT-PCR. Jako materiál pro zjištění přítomnosti virů v rostlinách česneku před ošetřením sloužily mladé listové čepele.

### **4.9 Třetí a čtvrtý rok experimentu**

#### **4.9.1 Detekce virů před a po aplikaci chemoterapie a izolaci meristému**

V experimentu bylo pracováno celkem s 651 stroužky česneku odrůdy 'Unikát', které byly děleny z 63 cibulí. Každá cibule byla testována na přítomnost virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV před procesem ozdravování metodou RT-PCR. Jako materiál pro zjištění přítomnosti virů v rostlinách česneku sloužily mladé listové čepele.

#### 4.9.2 Chemoterapie: působení antivirotik na stroužky

Počty stroužků převedných do aseptických podmínek u jednotlivých variant (A25, A50, R25, R50, Z25, Z50 a kontrola) jsou zobrazeny v Tab. 2. Vlivem mikrobiálních infekcí, případně špatnou izolací meristémů nebo neprorůstáním meristémů byly počty jedinců v jednotlivých variantách sníženy. Konečné počty jedinců ve všech variantách jsou uvedeny v kapitole Výsledky.

**Tabulka 2 Termíny a počty stroužků odrůdy česneku 'Unikát' převedných do aseptických podmínek u jednotlivých variant**

termín/varianta	A25	A50	R25	R50	Z25	Z50	C0
6.11.2012	0	0	24	24	24	24	20
5.12.2012	24	24	0	0	0	0	14
7.1.2013	24	24	0	0	0	0	0
27.2.2013	11	11	11	11	11	11	16
13.3.2013	12	12	12	12	12	12	13
10.2.2014	19	19	19	19	19	19	42
21.2.2014	17	17	17	17	17	17	0
celkem	107	107	83	83	83	83	105

Postupy izolace celkové rostlinné RNA, fluorometrické měření koncentrace RNA, sladění koncentrací RNA před reverzní transkripcí a reverzní transkripce byly shodné jako v prvním roce řešení.

#### 4.9.3 Polymerázová řetězová reakce

Po reverzní transkripci byly 2  $\mu\text{l}$  získané cDNA použity do polymerázové řetězové reakce (PCR). Celkový objem reakční směsi činil 25  $\mu\text{l}$  a obsahoval: HPLC vodu, 0,5  $\mu\text{l}$  (10mM) dNTPs (Invitek, Berlin, Německo); 0,75  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{M}$ ) každého primeru; 2,5  $\mu\text{l}$  pufru (dodávaného s polymerázou); 0,1  $\mu\text{l}$  5 U/  $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, Hitchin, UK). Sekvence primerů OYDV, LYSV a SLV (Tab. 1) byly použity dle publikace Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011).

Primery pro detekci viru GCLV dle Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011) nebyly ani po úpravě teplotního režimu pro další testování vhodné, jelikož se při vizualizaci objevovalo mnoho nespecifických produktů o různých velikostech

(Výsledky, Obr. 17). Nové primery pro detekci viru GCLV navržené ve spolupráci s Ing. Eichmeierem, Ph.D. jsou uvedeny v Tabulce 2.

Teplotní režim PCR byl optimalizován pro jednotlivé viry:

Pro viry OYDV a SLV:

94 °C 5 min.; 40 cyklů 94 °C 30 sek., 56 °C 45 sek., 68 °C 50 sek.; následovalo 68 °C 7 minut.

Pro viry GCLV a LYSV:

94 °C 5 min.; 40 cyklů 94 °C 30 sek., 48,5 °C 30 sek., 68 °C 45 sek.; následovalo 68 °C 7 minut.

#### 4.9.4 Navržení primerů pro detekci viru *Garlic common latent virus*

Pro detekci viru GCLV byly původně převzaty primery z publikace Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011). Po optimalizaci PCR (změna polymeráz, úprava koncentrace MgCl<sub>2</sub>, změna teploty annealingu) neposkytovala detekce prokazatelné výsledky, získané produkty nebyly jednoznačně a spolehlivě vyhodnotitelné. Proto byly pro detekci viru GCLV navrženy nové primery (Tab. 3). Primery byly navrhovány v programu CLC Main Workbench 5.0 (CLC Bio, Aarhus, Dánsko) a FastPCR (Helsinki, Finsko). Tyto primery amplifikují segment genomu, který kóduje část genu pro CP (coat protein) a částečně také gen NABP (nucleic acid binding proteins). Primery amplifikují produkt o celkové velikosti přibližně 782 párů bází. S novými primery byla přetestována celá kolekce izolátů rostlin česneku po procesu ozdravení.

**Tabulka 3** Sekvence primerů pro detekci GCLV

Garlic common latent virus	GCLVEAMK rev: 5'-CACGCC CTATCACACAA -3'
Garlic common latent virus	GCLVEAMK fwd: 5'-TAAGAAGTTCCAGGCAGACA-3'

#### 4.9.4.1 Vizualizace PCR produktů

Po PCR byly izoláty elektroforeticky separovány na 1,5% agarózovém gelu. Postup vizualizace PCR produktů byl shodný jako první rok.

#### 4.9.5 Relativní kvantifikace viru *Garlic common latent virus* (Real-Time PCR)

Pro potvrzení negativních výsledků pro přítomnost viru GCLV dle RT-PCR po ošetření chemoterapií nebo prostou izolací meristému byla optimalizována metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce. Byla navržena nová sada primerů a TaqMan sonda z oblasti genu kódující coat protein. Předpokládaná velikost fragmentu (amplikonu) je 212 pb. Real-time analýzy probíhaly v termocykleru Rotor-Gene 3000.

##### 4.9.5.1 Optimalizace detekce viru GCLV metodou Real-Time PCR

Pro testování bylo vybráno nejprve 5 izolátů, které byly dle RT-PCR negativní na přítomnost viru GCLV a 5 izolátů, které byly pozitivní. Pro ověření následovala rovněž klasická PCR s použitím primerů navržených pro Real-Time PCR.

**Real-Time PCR:** Celkový objem reakční směsi činil 20  $\mu$ l a obsahoval: HPLC vodu, 10  $\mu$ l 2x HoTaq Real-Time PCR kitu (MCLAB San Francisco, USA); 0,8  $\mu$ l (10  $\mu$ M) každého primeru; 0,4  $\mu$ l 100  $\mu$ M sondy Eurofins Genomics (Ebersberg, Německo) a 2  $\mu$ l cDNA. Primery jsou uvedeny v Tabulce 4. Teplotní režim byl nastaven dle pokynů výrobce.

Tabulka 4 Primery navržené pro Real-Time reakci

Garlic common latent virus	GCLV_AE_fwd: 5' -AATATGACAGCAGGTGAG -3'
Garlic common latent virus	GCLV_AE_rev: 5' -ATTTAGCAGTGATAGCGG -3'
Sonda	GCLV_AE_TP: 5' -AATGGAGGGTTTGAGACTGGGA 3'

**Klasická PCR detekce pomocí primerů pro Real-Time PCR:** Celkový objem reakční směsi činil 20,8  $\mu$ l a obsahoval: HPLC vodu; 1,2  $\mu$ l (25 mM) MgCl<sub>2</sub> (dodávaný s polymerázou); 0,2  $\mu$ l (10mM) dNTPs (Invitek, Berlin, Německo); 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M)

každého primeru; 4  $\mu$ l 5x Colorless pufru (dodávaného s polymerázou); 0,2  $\mu$ l GoTaqG2 Hot Start polymerázy (Promega, Fitchburg, USA); 0,7  $\mu$ l 5x Green Flexi pufru (dodávaný s polymerázou). Teplotní režim byl následující: 95 °C 3 min.; 40 cyklů 95 °C 40 sek., 49 °C 40 sek., 72 °C 40 sek.; následovalo 72 °C 7 minut.

#### 4.9.5.2 Metodika sekvenování

Pro potvrzení, že navržené primery pro Real-Time PCR detekují opravdu vir GCLV, byly produkty vzniklé po reakci Real-Time PCR sekvenovány.

**Purifikace DNA pro sekvenaci:** Pro purifikaci DNA před sekvenací byl použit kit NucleoSpin<sup>®</sup>Gel a PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL, Duren, Německo) dle protokolu od výrobce, přičemž amplifikované fragmenty byly vyříznuty přímo z agarózového gelu.

**Sekvenování PCR produktů:** K sekvenování bylo využito kitu BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Sekvenační reakce tzv. cycle sequencing (asymetrická PCR s využitím jednoho primeru) byla připravena z Ready Reaction Mix 2  $\mu$ l, primer 3,2 pmol (0,4  $\mu$ l 10mM primeru), 5krát Sequencing Buffer 4  $\mu$ l, celkový objem reakce byl 20  $\mu$ l. Dle koncentrace purifikované DNA byl dopočítán objem vody. Potřebné množství templátu by mělo splňovat podmínku alespoň 10 ng DNA/100 pb produktu.

Teplotní program sekvenační reakce byl následující: 96 °C 1 min-úvodní denaturace, 96 °C 20 sec, klesání teploty 1 °C/sec až na 50 °C 15 sec, zvyšování teploty 1 °C/sec, 60 °C 4 min, tento cyklus byl opakován 30krát, závěrečný krok klesání teploty 1 °C/sec na 4 °C.

Po ukončení sekvenační reakce byl k izolátu přidán příslušný objem roztoku SAM (90  $\mu$ l/20 $\mu$ l izolátu) a 20  $\mu$ l XTerminátoru/20  $\mu$ l izolátu. Následovalo intenzivní vortexování asi 10 min. Po dokonalé homogenizaci byly izoláty centrifugovány při 1000 g po dobu 2 minut. Supernatant o objemu 15  $\mu$ l byl přemístěn do nové ABI 310 mikrozkušavky. Takto připravený izolát byl podroben automatickému sekvenování na

genetickém analyzátoru ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Sekvence proběhla za využití amplifikačního reverse primeru.

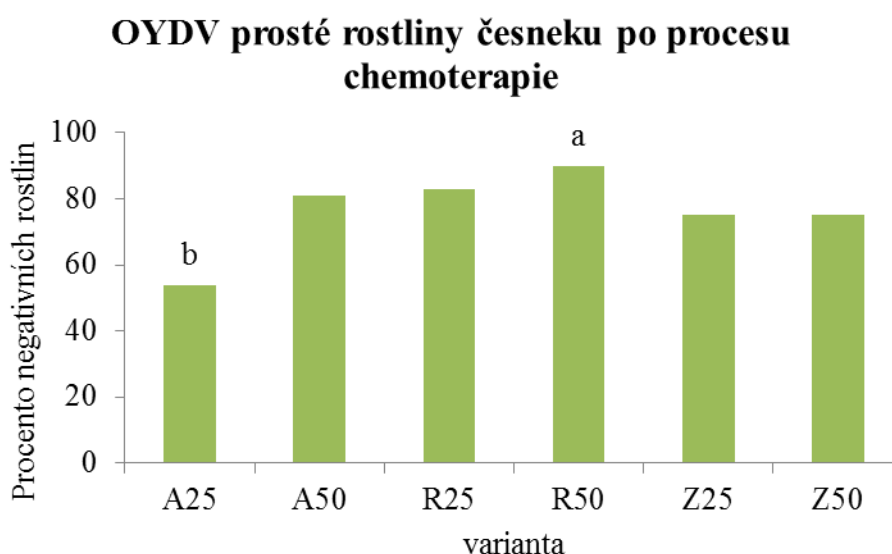
#### **4.10 Použité statistické metody**

K vyhodnocení průkaznosti rozdílů mezi jednotlivými variantami byla použita Analýza rozptylu. Průkaznost rozdílů byla testována na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ ) Duncanovým testem (Duncan's multiple range test, MRT). Výsledky byly analyzovány v programu Statistica 10 (StatSoft, Oklahoma, USA).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Chemoterapie: Působení antivirotik na mladé rostliny neúspěšně ozdravované meristémovou kulturou

Jednalo se o aplikaci chemoterapie na rostliny odrůdy 'D'Alsace Freres' kultivované *in vitro*, které byly v minulosti neúspěšně ozdravené metodou meristémových kultur. Výsledky testování metodou ELISA po aplikaci chemoterapie jsou graficky znázorněny na Obr. 7 až 10 .

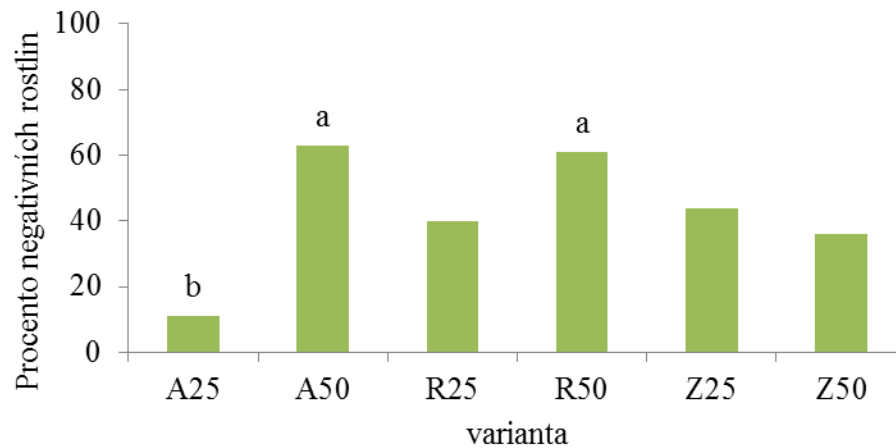


**Obrázek 7** Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru OYDV po chemoterapii

Odlíšná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Obr. 7 znázorňuje procento rostlin odrůdy česneku 'D'Alsace Freres', které byly úspěšně ozdraveny od viru OYDV chemoterapií s použitím acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup> (A25, Z25) nebo 50 mg.l<sup>-1</sup> (A50, R50, Z50). Nejvyššího počtu ozdravených rostlin (90 %) bylo dosaženo použitím rimantadinu v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup>. Statisticky průkazně méně efektivní bylo pouze použití acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (54 %), ostatní varianty chemoterapie byly pro eliminaci OYDV efektivní. Variantou A50 bylo dosaženo 81 % ozdravených jedinců, variantou R25 83 %, variantou Z25 i Z50 shodně 75 %.

### LYSV prosté rostliny česneku po procesu chemoterapie



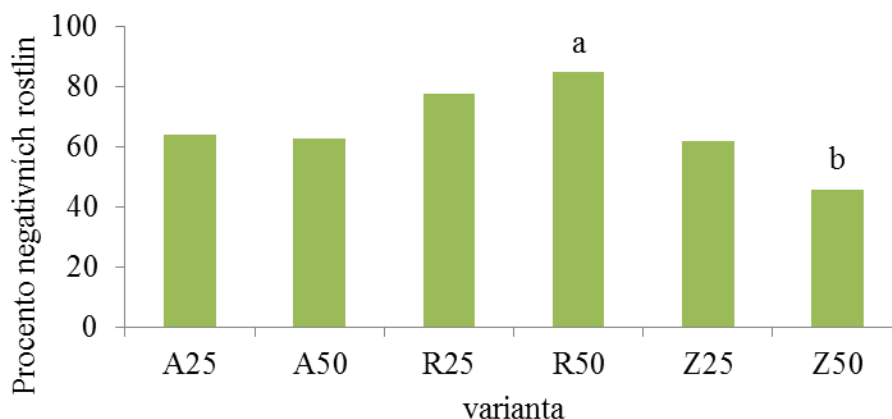
**Obrázek 8** Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru LYSV po chemoterapii

Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Obr. 8 znázorňuje procento rostlin odrůdy česneku 'D'Alsace Freres', které byly úspěšně ozdraveny od viru LYSV chemoterapií s použitím acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu v koncentracích  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  (A25, R25, Z25) nebo  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  (A50, R50, Z50). Nejvyššího počtu ozdravených jedinců bylo dosaženo použitím  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  acycloviru (63 %) nebo rimantadinu (61 %). Statisticky průkazný rozdíl v eliminaci viru LYSV byl pozorován mezi variantami A50, R50 a mezi variantou A25 (11 %). Ostatní varianty byly pro eliminaci LYSV méně efektivní (R25 40 %, Z25 44 %, Z50 36 %).



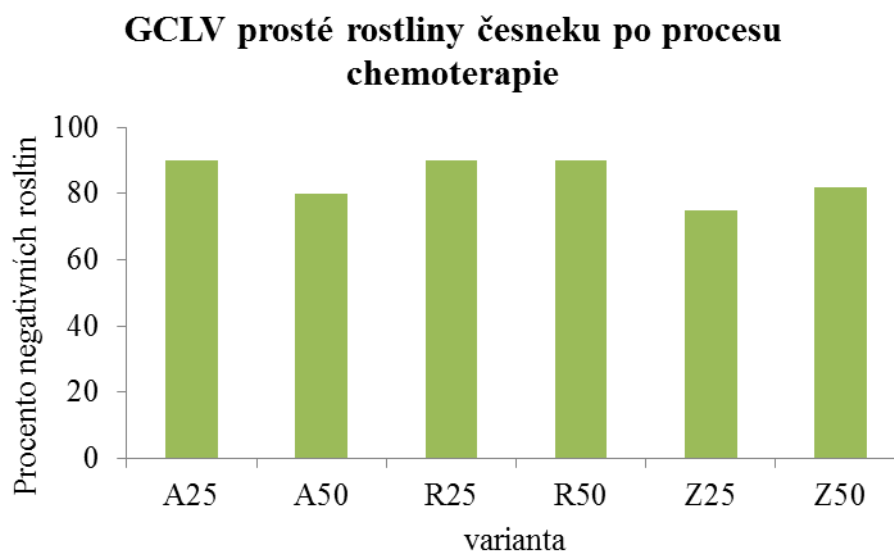
### SLV prosté rostliny česneku po procesu chemoterapie



Obrázek 9 Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru SLV po chemoterapii

Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Obr. 9 znázorňuje procento rostlin odrůdy česneku 'D'Alsace Freres', které byly úspěšně ozdraveny od viru SLV chemoterapií s použitím acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup> (A25, R25, Z25) nebo 50 mg.l<sup>-1</sup> (A50, R50, Z50). Nejvyšší procento ozdravených rostlin (85 %) bylo pozorováno po ošetření variantou s 50 mg.l<sup>-1</sup> rimantadinu. Statisticky prokazatelně nižší procento rostlin bylo ozdraveno variantou s 50 mg.l<sup>-1</sup> zidovudinu (46 %).



**Obrázek 10** Procento ozdravených rostlin odrůdy 'D'Alsace Freres' od viru GCLV po chemoterapii

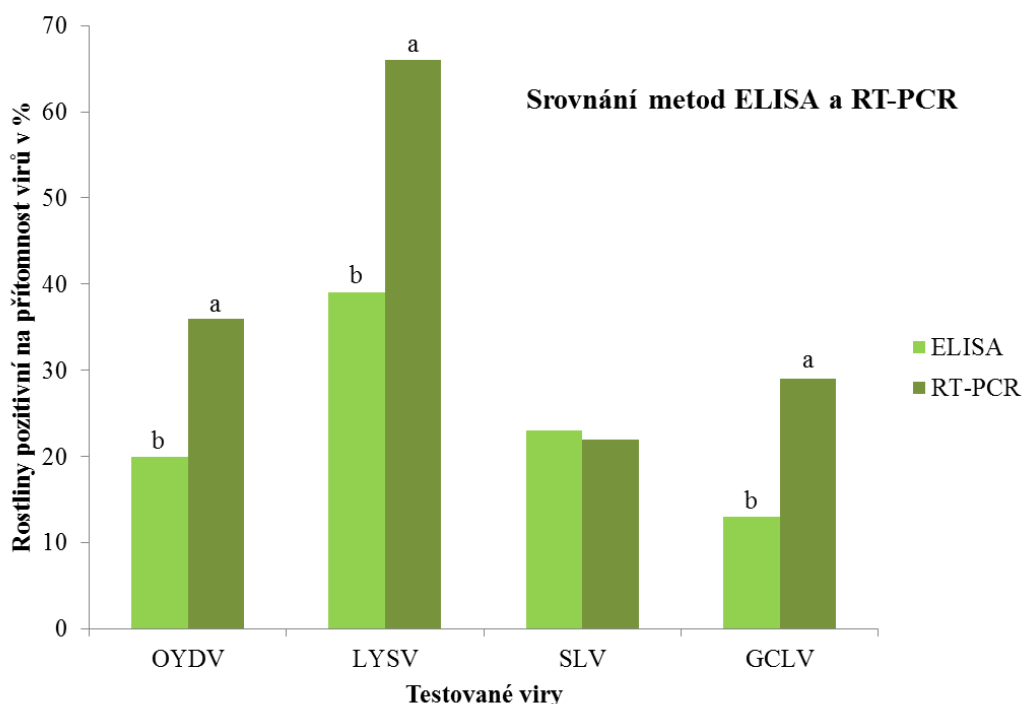
Obr. 10 znázorňuje procento rostlin odrůdy česneku 'D'Alsace Freres', které byly úspěšně ozdraveny od viru GCLV chemoterapií s použitím acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup> (A25, R25, Z25) nebo 50 mg.l<sup>-1</sup> (A50, R50, Z50). Mezi jednotlivými variantami nebyly pozorovány statisticky průkazné rozdíly. Variantami A25, R25 a R50 bylo dosaženo shodně 90 % ozdravených rostlin, variantou A50 80 %, variantami Z25 a Z50 75 % a 82 %.

Jak je patrné z Obr. 7 až 10, dvoutýdenní aplikace antivirotika rimantadin v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> (R50) měla u odrůdy česneku 'D'Alsace Freres' nejlepší efekt na eliminaci OYDV a SLV, spolu s variantou A50 u viru LYSV a spolu s variantami A25 a R25 u viru GCLV. Žádné z antivirotik nemělo během ani po uplynutí doby aplikace negativní vliv na zdravotní stav nebo vitalitu rostlin. Rostliny pěstované v *in vitro* podmínkách nevykazovaly žádné odlišnosti oproti rostlinám kultivovaným na běžném médiu (C1).

## **5.2 Srovnání výsledků testování *in vitro* rostlin česneku kuchyňského na přítomnost virů metodou ELISA a metodou RT-PCR**

V prvním roce experimentu byla metoda ELISA porovnána s metodou RT-PCR pro detekci virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV (kap. 4.7.2). Listové čepele sta rostlin česneku odrůdy 'Lukan' kultivovaného *in vitro* byly testovány oběma metodami.

Dle výsledků testování metodou ELISA byla přítomnost viru OYDV v rostlinách detekována ve 20 % rostlin, kdežto metoda RT-PCR byla schopna detekovat až 36 % pozitivních rostlin. Vir LYSV byl metodou ELISA detekován v 39 %, metodou RT-PCR v 66 % testovaných rostlin. GCLV metoda ELISA potvrdila u 13 % rostlin, metoda RT-PCR u 29 % testovaných rostlin. V případě všech tří virů byl mezi sérologickou a molekulárně-genetickou metodou potvrzen statisticky průkazný rozdíl (Obr. 11). Jediný vir, který nebyl detekován u více vzorků metodou RT-PCR (22 %) nežli metodou ELISA (23 %), byl vir SLV.



**Obrázek 11 Srovnání detekce virových patogenů metodou ELISA a RT-PCR u 100 rostlin česneku kuchyňského kultivovaného in vitro**

Odlíšná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Molekulární metoda RT-PCR tedy byla dle předpokladů citlivější a odhalila více virových infekcí. Pro další detekci virových patogenů u česneku byla pro disertační práci použita metoda RT-PCR.

### 5.3 Zjištění přítomnosti virů před aplikací chemoterapie a meristémové kultury

#### 'Blanin', 'Sukoradský', 'Japo' (druhý rok řešení disertační práce)

Při testování 10 rostlin odrůdy 'Blanin', 18 rostlin odrůdy 'Sukoradský' a 8 rostlin odrůdy 'Japo' bylo zjištěno, že všechny čtyři sledované viry byly přítomny ve všech testovaných rostlinách u všech tří odrůd. Celý komplex virů OYDV, LYSV, SLV GCLV byl tedy detekován ve 100 procentech.

#### 'Unikát' (třetí a čtvrtý rok disertační práce)

Při testování 63 rostlin česneku odrůdy 'Unikát' před aplikací chemoterapie bylo metodou RT-PCR zjištěno, že pouze v jedné rostlině nebyl přítomen žádný ze sledovaných virů (OYDV, LYSV, SLV, GCLV). Pro ošetření chemoterapií mohly být tudíž použity všechny cibule kromě této jedné. Naopak všechny čtyři sledované viry byly detekovány v devíti rostlinách (Tab. 5). Nejčastěji se vyskytujícím virem byl SLV (97 %), dále GCLV (57 %), OYDV (43 %) a LYSV (35 %). Nejčastěji byly rostliny infikovány kombinací dvou virů (42,9 %), viz Tab. 5, z toho byla největším podílem zastoupena dvojice virů SLV + GCLV (téměř 24 %), viz Tab. 6.

Tabulka 5 Kombinace směsných infekcí v rostlinách česneku odrůdy 'Unikát'

Virové infekce česneku odrůdy 'Unikát'	Počet položek	%
zdravé rostliny	1	1,6
rostliny infikované jedním virem	11	17,4
rostliny infikované dvěma viry	27	42,9
rostliny infikované třemi viry	15	23,8
rostliny infikované čtyřmi viry	9	14,3
celkem	63	100

**Tabulka 6 Kombinace virových patogenů v rostlinách česneku odrůdy 'Unikát'**

Infekce jedním virem	Počet položek	%
OYDV	1	1,6
LYSV	0	0
SLV	10	15,9
GCLV	0	0
Dvojité infekce	Počet položek	%
OYDV + LYSV	0	0
OYDV + SLV	5	7,9
OYDV + GCLV	0	0
LYSV + SLV	7	7,9
LYSV + GCLV	0	0
SLV + GCLV	15	23,8
Trojité infekce	Počet položek	%
OYDV + LYSV + SLV	3	4,8
OYDV + LYSV + GCLV	0	0
OYDV + SLV + GCLV	9	14,2
LYSV + SLV + GCLV	3	7,8

Jak bylo zmíněno již v kapitole Materiál a metodika, bylo původním záměrem provést podobný sled testování i u odrůdy 'Dukát'. Z důvodu mikrobiálních infekcí jej ale nebylo možné převést do aseptických podmínek ani v jednom roce a v práci není hodnocen. Díky mikrobiálním infekcím nebylo ani možné odebrat listové čepele pro testování přítomnosti virových patogenů před ozdravováním.

#### **5.4 Chemoterapie: Působení antivirotik na izolované růstové vrcholy odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' (druhý rok řešení disertační práce)**

Kultivace růstových vrcholů nebyla úspěšná, ani u jedné z variant nebylo dosaženo prorůstání explantátů (Tab. 7). Prorůstání bylo pozorováno pouze na začátku kultivace u 11 izolovaných vrcholů, u kterých však následně došlo k zastavení růstu. Pasážování bylo následně zkráceno na dva týdny, bylo připraveno nové médium (médium i zásobní roztoky byly připraveny jinou osobou, aby byl vyloučen lidský faktor), ale ani po těchto modifikacích nebylo pozorováno prorůstání explantátů. Na explantátech nebylo pozorováno žádné poškození (např. hnědnutí, zasychání nebo mikrobiální infekce).

Další rok bylo proto přistoupeno v laboratoři již k ověřenému způsobu aplikace antivirotik, tzn. aplikace antivirotik do média C0 (tzn. CA médium), média určeného pro primární kultivaci celých stroužků (Působení antivirotik na stroužky), který byl zaveden při řešení projektu NAZV.

**Tabulka 7 Převody stroužků a vyhodnocení růstu odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo'**

<b>Blanin</b>	<b>celkem</b>	<b>A25</b>	<b>A50</b>	<b>R25</b>	<b>R50</b>	<b>Z25</b>	<b>Z50</b>	<b>C0</b>
počet založených stroužků	74	-	-	-	-	-	-	-
počet mikrobiálních kontaminací	24	-	-	-	-	-	-	-
počet izolovaných meristémů	50	7	7	7	7	7	7	8
prorostlé meristémy	3	1	0	0	2	0	0	0
<b>Sukoradský</b>	<b>celkem</b>	<b>A25</b>	<b>A50</b>	<b>R25</b>	<b>R50</b>	<b>Z25</b>	<b>Z50</b>	<b>C0</b>
počet založených stroužků	210	-	-	-	-	-	-	-
počet mikrobiálních kontaminací	35	-	-	-	-	-	-	-
počet izolovaných meristémů	175	25	25	25	25	25	25	25
prorostlé meristémy	3	0	0	0	0	0	0	3
<b>Japo</b>	<b>celkem</b>	<b>A25</b>	<b>A50</b>	<b>R25</b>	<b>R50</b>	<b>Z25</b>	<b>Z50</b>	<b>C0</b>
počet založených stroužků	100	-	-	-	-	-	-	-
počet mikrobiálních kontaminací	9	-	-	-	-	-	-	-
počet izolovaných meristémů	91	13	13	13	13	13	13	13
prorostlé meristémy	5	1	0	0	2	0	0	2

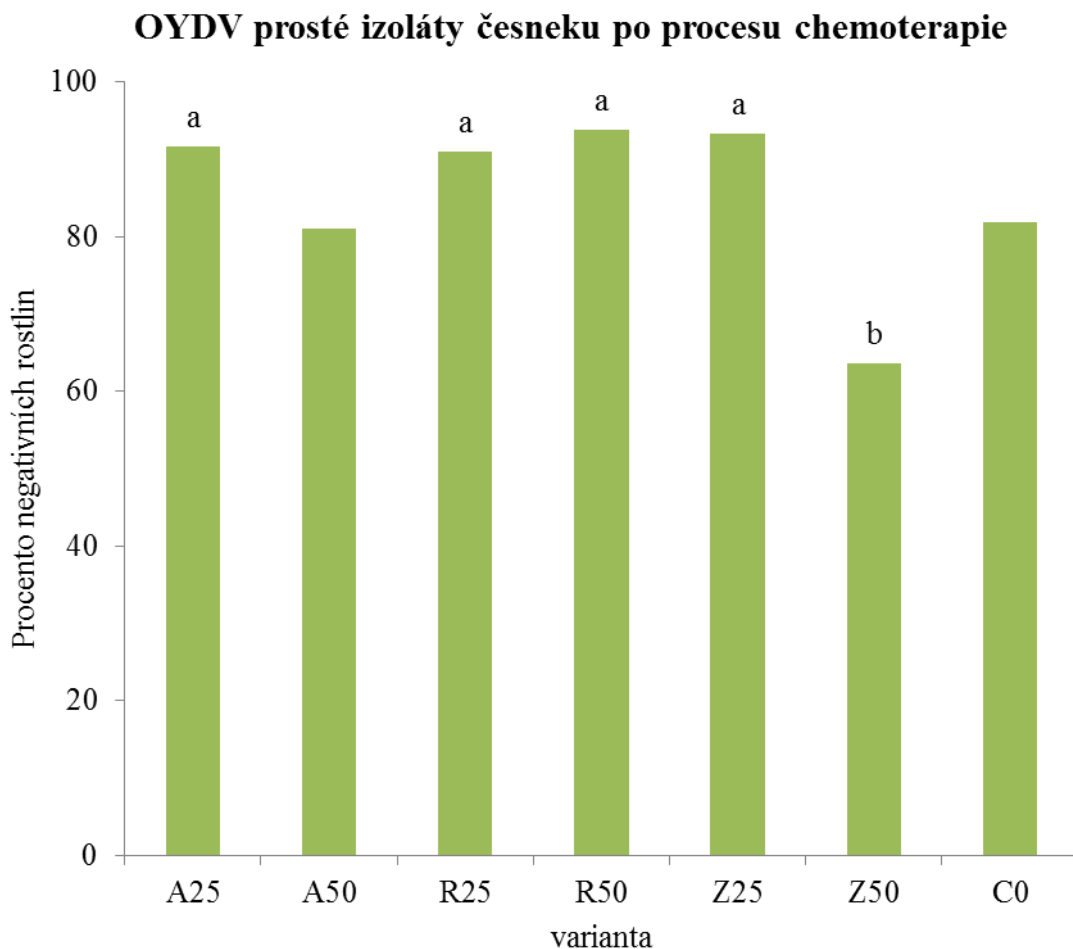
## 5.5 Chemoterapie: Působení antivirotik na stroužky

V posledních dvou letech pokusu bylo do aseptických podmínek převedeno a chemoterapií nebo prostou izolací meristému ošetřeno celkem 651 stroužků odrůdy 'Unikát'. Počet převedných stroužků a počet mladých rostlin, u kterých byla kultivace úspěšná, a které byly následně testovány na přítomnost virů po ošetření, je znázorněn v Tab. 8. Celkem bylo testováno 209 rostlin po ošetření.

**Tabulka 8 Počet převedených stroužků odrůdy česneku 'Unikát' u jednotlivých variant**

varianta	<b>A25</b>	<b>A50</b>	<b>R25</b>	<b>R50</b>	<b>Z25</b>	<b>Z50</b>	<b>C0</b>
počet založených stroužků	<b>107</b>	<b>107</b>	<b>83</b>	<b>83</b>	<b>83</b>	<b>83</b>	<b>105</b>
počet mikrobiálních infekcí	76	74	35	26	32	26	50
počet izolovaných meristémů	31	33	48	57	51	57	55
neporostlé meristémy, kontaminace	0	0	20	31	21	33	18
konečný počet testovaných rostlin	<b>31</b>	<b>33</b>	<b>28</b>	<b>26</b>	<b>30</b>	<b>24</b>	<b>37</b>

Úspěšnost eliminace čtyř sledovaných virových patogenů je znázorněna v grafech 6 až 10.

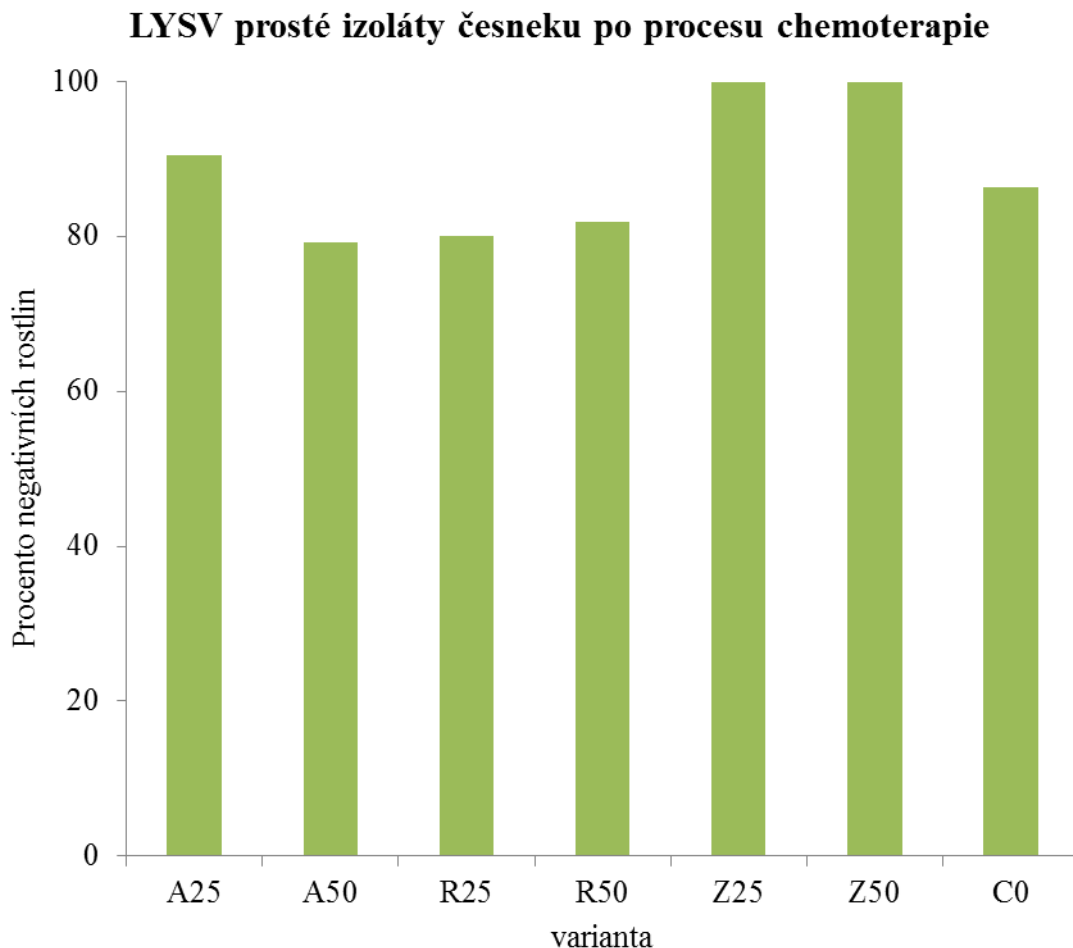


**Obrázek 12** Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru *Onion yellow dwarf virus*

Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Eliminace viru *Onion yellow dwarf virus* byla úspěšná s použitím všech variant ošetření. I přesto, že byla sledována vyšší úspěšnost eliminace OYDV v případě použití antivirotika acyclovir, rimantadin a částečně zidovudin, nepodařil se prokázat statisticky průkazný rozdíl mezi prostou meristémovou kulturou (81 % ozdravených jedinců) a aplikací chemoterapie. Statisticky průkazný rozdíl byl pozorován pouze mezi aplikací zidovudinu Z50 v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> (63 %) a jeho poloviční koncentrací Z25 (93 %), dále pak mezi Z50 a oběma koncentracemi rimantadinu (R25 90 % a R50 93 %) a

mezi Z50 a aplikací 25 mg.l<sup>-1</sup> acycloviru (A25 91 %). Z celkového počtu 120 provedených testů bylo 85 % izolátů negativních na přítomnost OYDV.

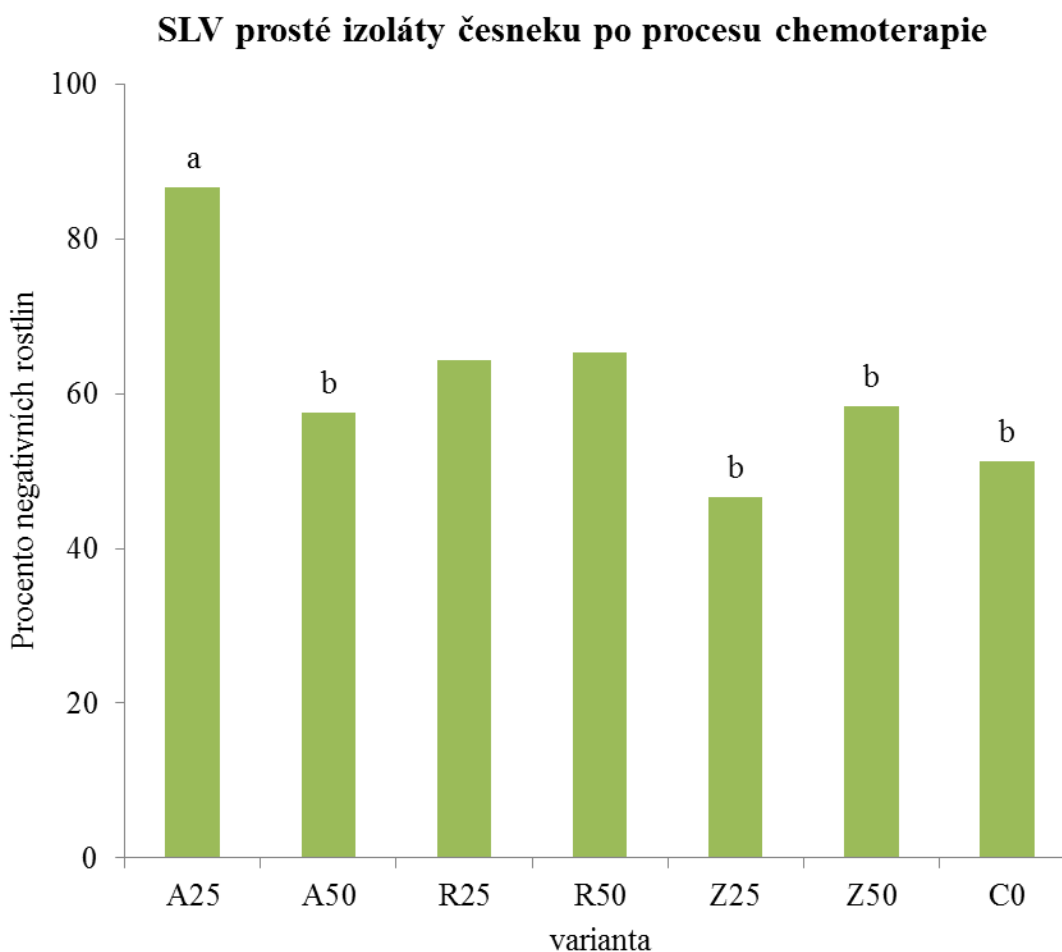


**Obrázek 13** Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru *Leek yellow stripe virus*

Při aplikaci antivirotik pro eliminaci viru *Leek yellow stripe virus* bylo pozorováno 100 % ozdravených rostlin po ošetření zidovudinem v obou koncentracích (25 mg.l<sup>-1</sup> Z25, 50 mg.l<sup>-1</sup> Z50). Aplikací acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (A25) bylo dosaženo 90 % ozdravených rostlin, v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> (A50) potom 79 %. Po aplikaci rimantadinu bylo vyhodnoceno 80 a 81 % rostlin jako ozdravených (R25 90 % a R50 93 %). Použití kontrolní metody (C0), metody meristémových kultur, bylo pro eliminaci viru LYSV také úspěšné. Bylo pozorováno 86 % ozdravených rostlin. Z celkového počtu 110 provedených testů bylo 87 % izolátů negativních na přítomnost



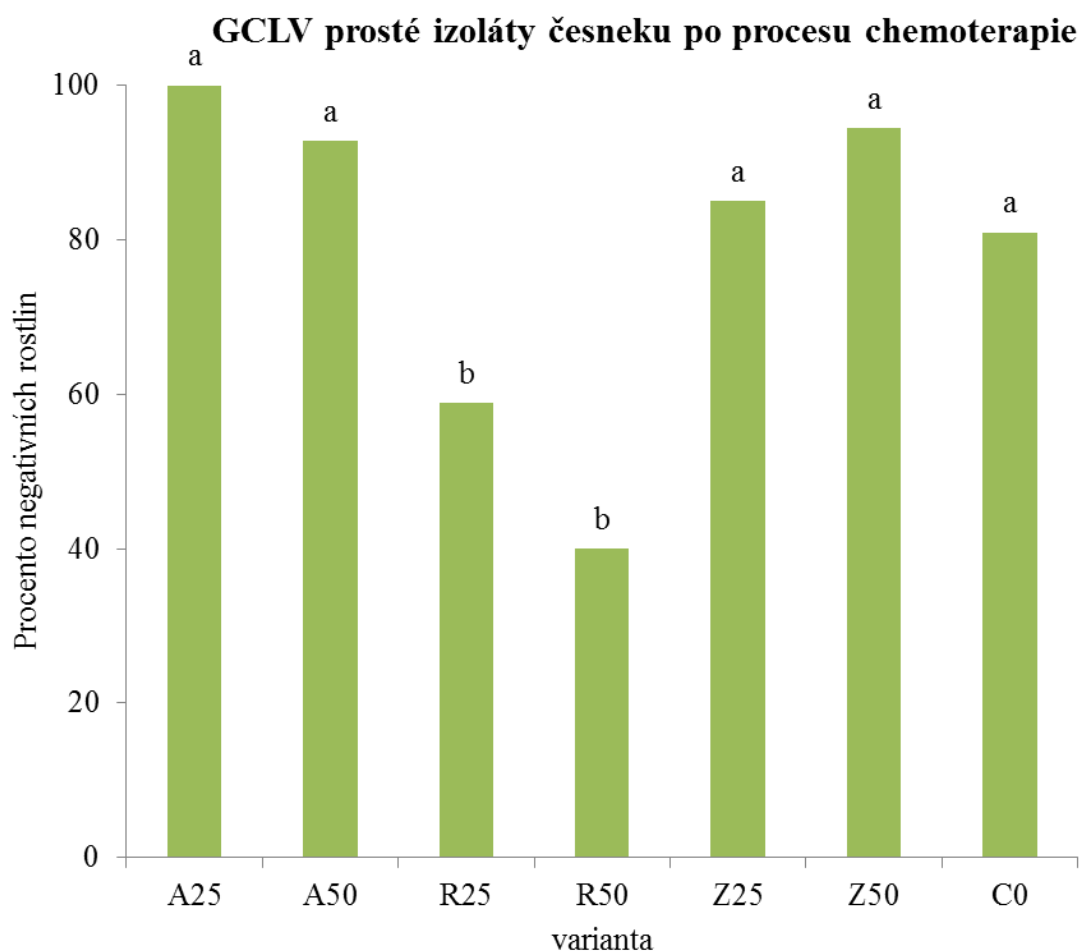
LYSV. Mezi jednotlivými variantami ošetření nebyly pozorovány statisticky průkazné rozdíly.



**Obrázek 14** Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru *Shallot latent virus*

Odlíšná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

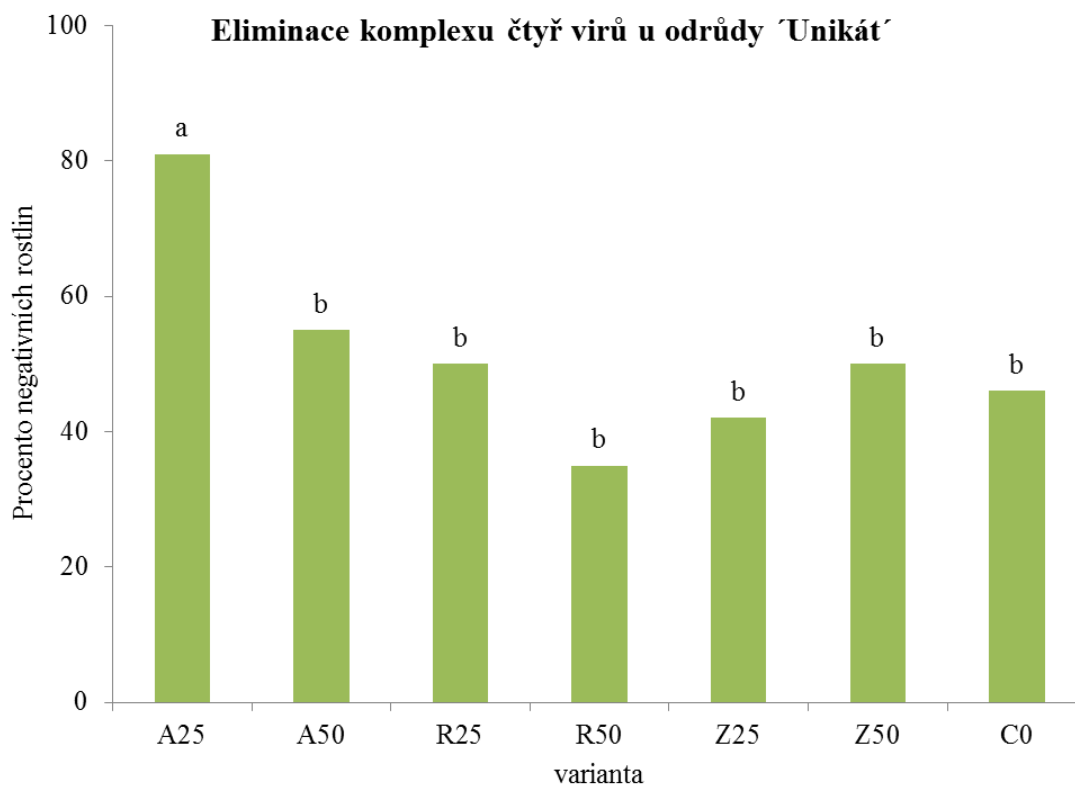
Nejvyššího počtu rostlin ozdravených od viru *Shallot latent virus* bylo pozorováno u rostlin ošetřených acyclovirem A25 v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (86 %). Statisticky průkazný rozdíl byl pozorován mezi variantou A25 a variantami A50 (57 %), Z25 (46 %), Z50 (58 %) a kontrolní variantou C0 (51 %). Použitím rimantadinu v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup> a 50 mg.l<sup>-1</sup> bylo dosaženo 64 a 65 % ozdravených rostlin. Z celkového počtu 208 provedených testů bylo 61 % izolátů negativních na přítomnost SLV.



**Obrázek 15** Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od viru *Garlic common latent virus*

Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Pro testování GCLV byl použit nově navržený detekční systém, jehož vývoj a ověření je popsán v kapitole 4.9.4. Po aplikaci chemoterapie a meristémové kultury bylo pozorováno nejvíce ozdravených rostlin od viru *Garlic common latent virus* u varianty acycloviru v obou koncentracích (A25 100 %; A50 92 %) a u varianty zidovudinu (Z 25 85 %; Z50 94 %). Následovala kontrolní varianta C0 (80 %). Oproti všem variantám ošetření bylo aplikací rimantadinu v obou koncentracích eliminováno prokazatelně nižší procento rostlin (R25 58 %; R50 40 %). Z celkového počtu 150 provedených testů bylo 80 % izolátů negativních na přítomnost GCLV.



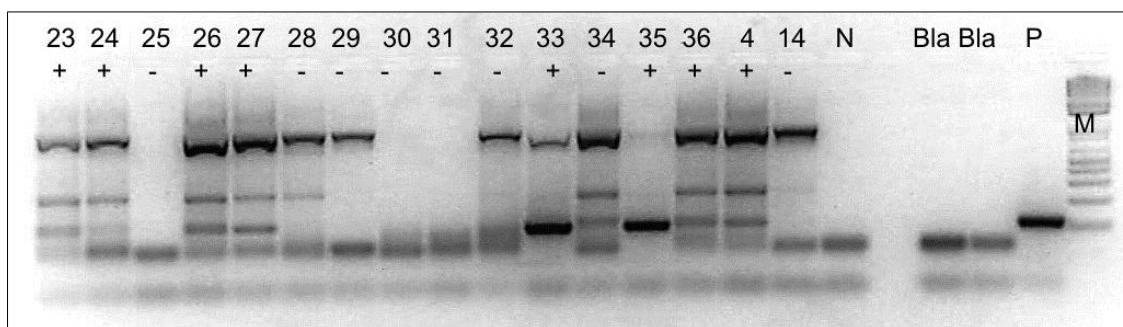
**Obrázek 16** Procento ozdravených rostlin odrůdy česneku 'Unikát' od sledovaného komplexu virů

Odlišná písmena značí statisticky průkazné rozdíly mezi variantami dle Duncanova testu (MRT).

Jak je patrné z Obr. 16, jako nejefektivnější antivirotikum pro eliminaci sledovaného komplexu virů byl acyclovir v koncentraci  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  (A25). Celkově bylo po ošetření touto variantou dosaženo 81 % jedinců prostých všech sledovaných virů.

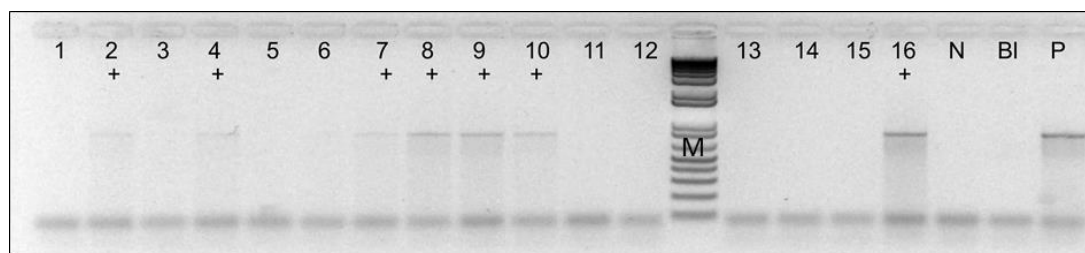
## 5.6 Nové systémy pro detekci a kvantifikaci viru *Garlic common latent virus*

Pro detekci viru GCLV byly původně převzaty primery z publikace Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011). Detekce viru GCLV těmito primery však ani po optimalizaci PCR (změna polymeráz, úprava koncentrace  $\text{MgCl}_2$ , změna teploty annealingu) nebyla spolehlivě vyhodnotitelná (Obr. 17). Z důvodu potřeby zvýšit přesnost a věrohodnost výsledků byly proto pro detekci viru GCLV navrženy nové primery (Tab. 2). S nově navrženými primery (Obr. 18) byla přetestována a vyhodnocena celá kolekce izolátů česneku.



**Obrázek 17** Vizualizace produktů na agarózovém gelu po detekci viru *Garlic common latent virus* metodou RT-PCR dle primerů Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011).

Velikost produktů PCR je přibližně 106 párů bází. Produkty s velikostí pod 100 párů bází jsou dimery primerů.; 24 až 36, 4, 14 – testované rostliny česneku; (-) – izoláty negativní na přítomnost viru GCLV; (+) – izoláty pozitivní na přítomnost viru GCLV; M – 1 Kb Plus DNA Ladder ; N – negativní kontrola; P – pozitivní kontrola; Bla – slepý vzorek



**Obrázek 18** Vizualizace produktů na agarózovém gelu po detekci viru *Garlic common latent virus* metodou RT-PCR s použitím navržených primerů.

Velikost produktů PCR je přibližně 782 párů bází. Produkty s velikostí pod 100 párů bází jsou dimery primerů; 1 až 16 – testované rostliny česneku; (+) – izoláty pozitivní na přítomnost viru GCLV; M – 1 Kb Plus DNA Ladder; N – negativní kontrola; P – pozitivní kontrola; BI – slepý vzorek

### 5.6.1 Relativní kvantifikace viru *Garlic common latent virus* (Real-Time PCR)

V rámci procesu ozdravování může mnohé zásadní informace přinést detekční systém, kterým by bylo možné kvantifikovat množství virových partikulí v analyzovaných pletivech. Tuto schopnost skýtají metody Real-Time PCR, přičemž dobře fungující systém umožní vyšší efektivitu detekce (odpadá potřeba provádět

separaci amplionů na agaróze). Real-Time PCR Detekční systém byl navržen opět na GCLV.

Po detekci pěti izolátů pozitivních na přítomnost viru GCLV a pěti izolátů negativních byla metodou Real-Time PCR u pozitivních vzorků přítomnost viru jednoznačně potvrzena u tří izolátů (v Tabulce 9 vyznačeny tučně). U negativních izolátů nebyly výsledky zcela jednoznačné ani po opakování (Tab. 9). S primery navrženými pro Real-Time PCR byl proto připraven mastermix pro běžnou PCR (myšleno v této práci, kap. 4.7.2.5) a produkty byly vizualizovány na 1,2% agarózovém gelu. Pro srovnání byl také připraven mastermix pro běžnou PCR s použitím GoTaqG2 Hot Start polymerázy (Promega, Mannheim, Německo; viz Tab. 9, poslední sloupec).

**Tabulka 9 Rozdílnost výsledků detekce viru GCLV při použití různých metod**

izolát	RT-PCR_NEB	Real-Time	Real-Time 2	vizualizace_gel	RT-PCR_HotStart
1	P	N	N	P	P
2	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
3	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
4	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
5	P	N	N	P	P
6	N	N	N	P	P
7	N	P	N	P	P
8	N	P	N	P	P
9	N	N	P	P	P
10	N	N	P	P	P

P – pozitivní na GCLV

N – negativní na GCLV

RT-PCR\_NEB – detekce viru s použitím Taq DNA polymerázy (New England Biolabs)

Real-Time – Real-time PCR první běh

Real-Time 2 – opakování s použitím Taq DNA polymerázy (New England Biolabs)

Vizualizace\_gel – vizualizace PCR produktů po reakci Real-Time PCR na 1,2% agarózovém gelu

RT-PCR\_HotStart – detekce viru s použitím GoTaqG2 Hot Start polymerázy (Promega)

### 5.6.2 Sekvence: Objasnění nejednoznačných výsledků při detekci viru GCLV

Jelikož došlo k rozporu mezi výsledky RT-PCR a výsledky Real-Time PCR, byly vybrány tři různé izoláty pozitivní na přítomnost GCLV z druhého běhu Real-Time PCR (tzn. Real-Time 2 v Tab. 9), které byly po vizualizaci na gelu osekvenovány. Jednalo se o izoláty 2, 3, 4, (viz Tab. 9, sloupec „vizualizace\_gel“). Tento způsob detekce vykazoval nejvíce pozitivních izolátů.

Sekvenací bylo potvrzeno, že navržené primery amplifikovaly očekávaný fragment viru GCLV.

### 5.6.3 Validace Real-Time PCR

Tabulka 10 Příklad detekce viru GCLV metodou Real-Time PCR u náhodných 15 izolátů česneku odrůdy 'Unikát'

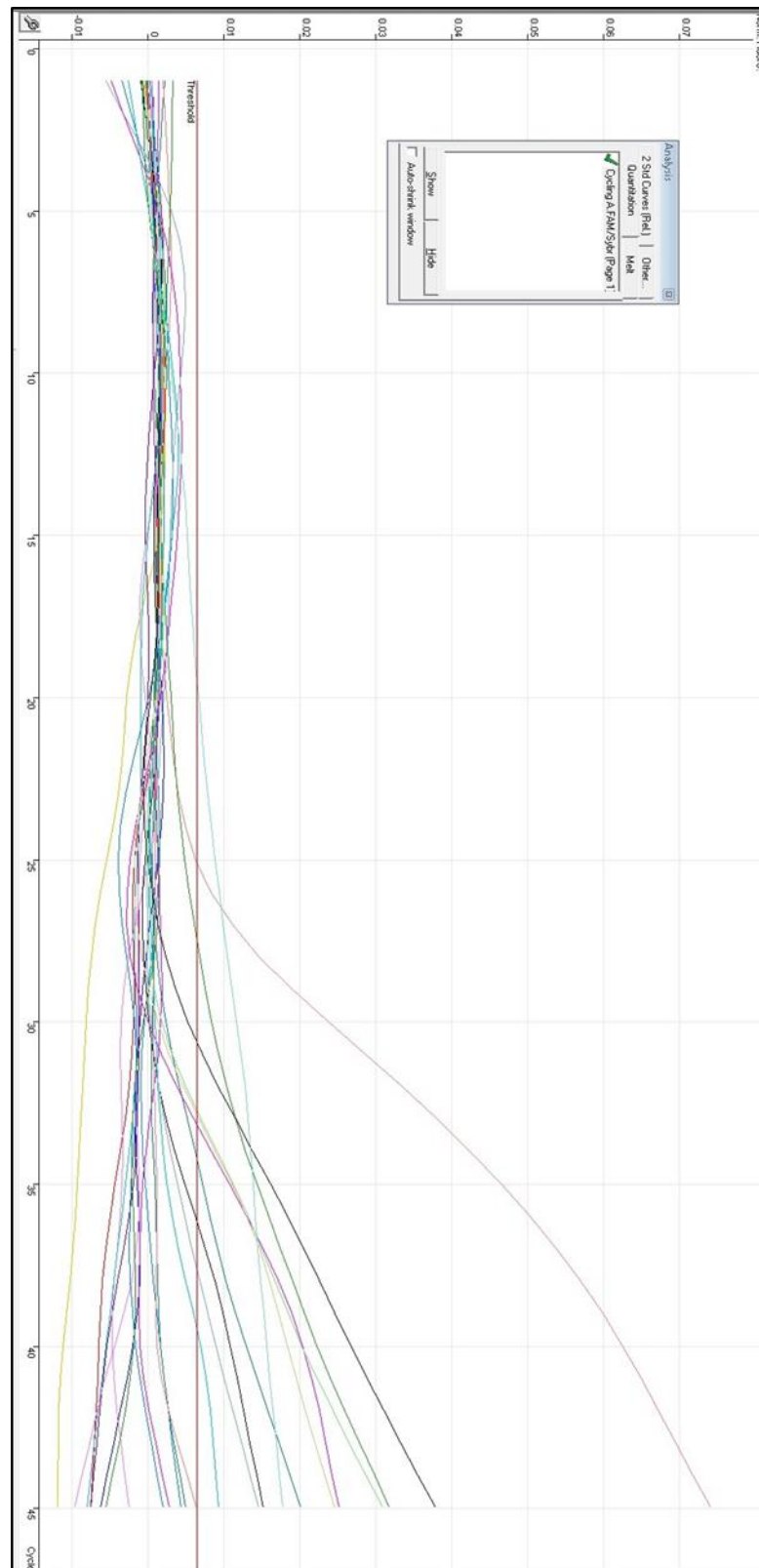
No.	Name	Type	Ct
1	31.1./7	Unknown	34,29
2	31.1./13	Unknown	36,21
3	31.1./11	Unknown	
4	15.5./16	Unknown	33,21
5	16.9./11	Unknown	30,7
6	31.1./16	Unknown	
7	31.1./8	Unknown	25,16
8	4.2./5	Unknown	
9	31.1./9	Unknown	27,64
10	18.9./4	Unknown	32,93
37	4.2./6	Unknown	
38	4.2./3	Unknown	37,73
39	20.9./3	Unknown	32,79
40	4.2./8	Unknown	
41	25.4./14	Unknown	
42	31.1./1	Negative Control	
43	Bla	Unknown	
44	Bla	Unknown	
45	24.9./15	Positive Control	19,67

Jako pozitivní reakce jsou vyhodnoceny izoláty, u kterých byla protnuta prahová hodnota Ct (cycle threshold).

Ct < 29 silně pozitivní reakce

Ct 30 – 37 pozitivní reakce

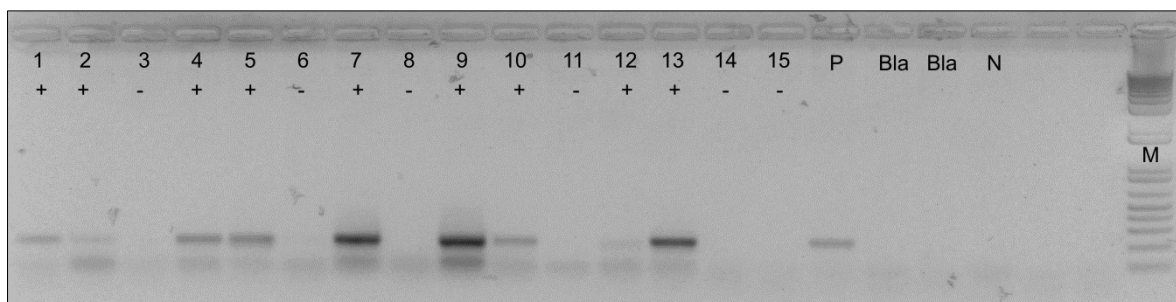
Cts 38 – 40 slabá reakce indikující minimální množství nukleové kyseliny, která reprezentuje infekci. Na takto nízké úrovni se však může jednat i o kontaminace



Obrázek 19 Příklad průběhu Real-Time PCR u náhodných 15 izolátů česneku odrůdy 'Unikát'

#### 5.6.4 Porovnání výsledků metody RT-PCR a metody Real-Time PCR pro detekci viru GCLV

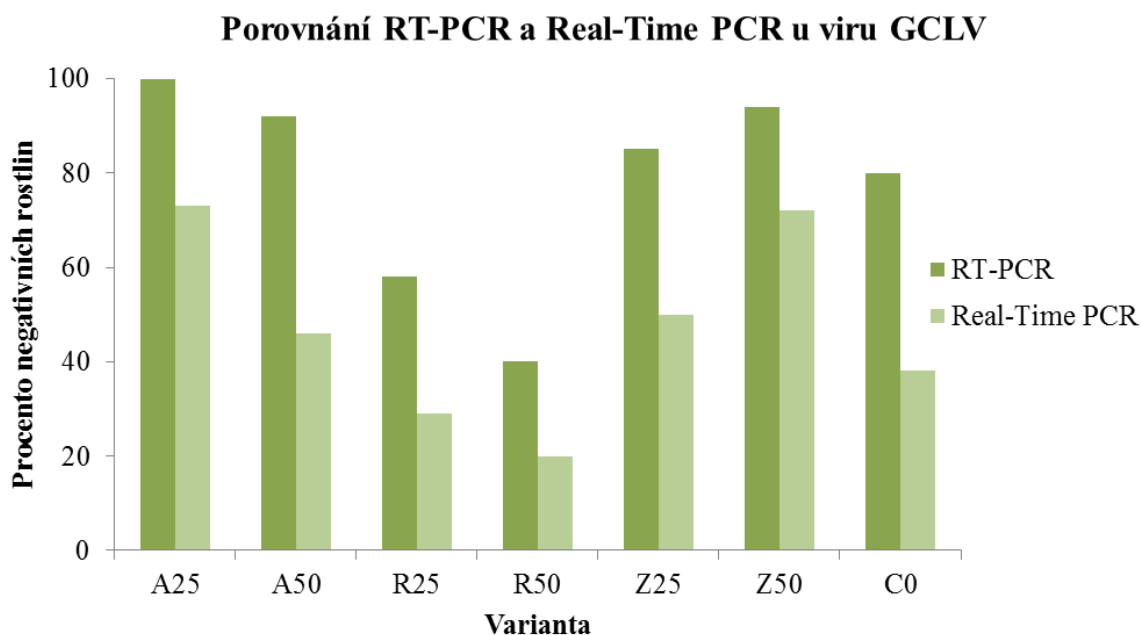
Při detekci viru GCLV metodou RT-PCR s použitím Taq DNA polymerázy (New England Biolabs) bylo celkem 121 izolátů česneku vyhodnoceno jako negativní. Soubor těchto izolátů (negativních na přítomnost GCLV) byl následně otestován validovanou metodou Real-Time PCR. Po Real-Time PCR byly produkty ještě pro kontrolu elektroforeticky separovány na 1,2% agarózovém gelu (Obr. 20). Po detekci 121 izolátů česneku metodou Real-Time PCR bylo zjištěno, že pouze 68 (56 %) izolátů ze 121 bylo negativních na přítomnost viru GCLV. U zbývajících 52 izolátů byla zjištěna pozitivní reakce (Příloha č. 1). Rozdílnost metod RT-PCR a Real-Time PCR je dokumentována také prostřednictvím agarózového gelu (Obr. 21).



**Obrázek 20** Příklad vizualizace produktů PCR na agarózovém gelu po detekci viru Garlic common latent virus metodou Real-Time PCR.

Velikost produktů PCR je přibližně 193 párů bází; 1 až 15 – testované izoláty česneku; (+) – izoláty pozitivní na přítomnost viru GCLV; (-) – izoláty negativní na přítomnost viru GCLV; M – 1 Kb Plus DNA Ladder ; N – negativní kontrola; P – pozitivní kontrola; Bla – slepý vzorek





**Obrázek 21 Porovnání detekce přítomnosti viru GCLV metodou RT-PCR a metodou Real-Time PCR**

Z Obr. 21 je patrné, že metoda Real-Time PCR byla pro detekci viru GCLV u česneku odrůdy 'Unikát' citlivější a odhalila více infekcí u všech variant. Lze tedy konstatovat, že původní úspěšnost chemoterapie varianty A25 byla snížena ze 100 % izolátů negativních na přítomnost viru GCLV na 73 %, u varianty A50 bylo snížení z 92 % na 46 %, u varianty R25 z 58 % na 29 %, u varianty R50 ze 40 % na 20 %, u varianty Z25 z 85 % na 50 %, u varianty Z50 z 94 % na 72 % a u kontrolní metody (C0, prostá meristémová kultura) z 80 % na 38 %. Pro eliminaci komplexu virů u česneku zůstává i při detekci pomocí Real Time PCR nejefektivnější variantou použití acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup>.

## 6 DISKUSE

### 6.1 *In vitro* kultivace rostlinného materiálu

V experimentu bylo pracováno celkem s šesti odrůdami česneku kuchyňského. Kromě jedné francouzské odrůdy byly použity odrůdy české. *In vitro* kultivace rostlin všech odrůd probíhala ve stejných podmínkách. Během kultivace bylo zjištěno, že ne všechny odrůdy stejného rostlinného druhu, v tomto případě česneku kuchyňského, je možné v aseptických podmínkách stejně úspěšně kultivovat. První rozdíly nastaly již v převodu rostlin do aseptických podmínek. V *in vitro* laboratoři Mendeleum-ústavu genetiky, ZF MENDELU v Lednici bylo dlouholetými pozorováními zjištěno, že nejúčinnější látkou pro povrchovou desinfekci rostlinného materiálu je aplikace 0,2% roztoku chloridu rtuťnatého (Křížan a kol., 2004; Naušová a kol., 2008; Ondrušiková a kol., 2009). Toto bylo potvrzeno obzvláště u explantátů podzemních orgánů (cibule, hlízy, kořeny). Nicméně i tato povrchová desinfekce byla u odrůdy 'Dukát' ve dvou letech neúčinná a celá varianta byla znehodnocena mikrobiálními infekcemi. Naopak u odrůd 'Japo' a 'Sukoradský' byly ztráty vlivem mikrobiálních infekcí minimální (9 % a 16 %).

Někteří autoři prací zabývajících se eliminací virů v česneku částečně předcházejí problému mikrobiálních kontaminací tím, že po povrchové desinfekci ihned izolují apikální meristémy (Bruna, 1997; Senula a kol., 2000) nebo menší explantáty, které jsou kultivovány, a k izolaci samotného meristému dochází později. Ramírez-Malagón (2006) ovšem uvádí, že kontaminace sníženy nebyly a docházelo pouze k tomu, že infekce byly pozorovány v kratším časovém horizontu. Při přímé izolaci meristémů, bez kultivace celých stroužků, nebyl pozorován žádný růst explantátů, ani po následných, častějších subkultivacích na nové médium.

Dalším opatřením zvyšujícím úspěšnost kultivace rostlin česneku nebo snížení následné hyperhydratace je předkultivace stroužků česneku při nízkých teplotách (0-11 °C) po dobu jednoho týdne až několika měsíců (Pateña a kol., 2005; Shibolet a kol., 2001). Jak uvádí Havránková, Havránek (1987), nejlepší období pro excizi apikálních meristémů je prosinec až leden. Tento termín podporuje Brewster (2008), který uvádí teplotu potřebnou k překonání dormance česneku v rozmezí 5 až 10 °C. Pokud jsou tedy

cibule česneku po sklizni správně skladovány (dle Petříková a kol. (2006) při 0-5 °C a 65% vlhkosti) a meristémy izolovány v zimním období, dochází k ošetření chladem za přirozených podmínek.

## 6.2 Zjištění přítomnosti virových patogenů před chemoterapií

Pro první rok experimentu byl vybrán pouze materiál, u kterého byla detekována přítomnost všech čtyř sledovaných virů – OYDV, LYSV, SLV a GCLV. Jednalo se o materiál, který byl neúspěšně ozdravován metodou izolace meristému, což bylo zjištěno detekcí metodou ELISA. V dalších letech experimentu byla vyhodnocena přítomnost virů před chemoterapií u rostlin odrůd česneku 'Blanin', 'Sukoradský', 'Japo' a 'Unikát', pocházejících a vypěstovaných v České republice, na kterou byla aplikována hlavní část experimentu.

U odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' byl celý komplex virů detekován u 100 % testovaných rostlin. V testovaném souboru odrůdy 'Unikát' byla pouze jedna rostlina prostá všech čtyř sledovaných virů. Naopak přítomnost celého komplexu virů byla u této odrůdy detekována pouze u 14 % rostlin. Karlová a kol. (2009) detekovali v souboru 104 genotypů pouze jeden genotyp, kde nebyla zjištěna přítomnost virů. U 50 genotypů byly detekovány všechny čtyři sledované viry. Klukáčková a kol. (2004) detekovali v česneku z Oddělení genové banky komplex všech čtyř virů u 18 %.

V předkládané práci byly rostliny odrůdy 'Unikát' nejčastěji infikovány kombinací dvou virů (42,9 %), z toho byla největším podílem zastoupena dvojice virů SLV + GCLV (téměř 24 %). Tuto nejčastější kombinaci virů potvrzují také Smékalová a kol. (2010). U trojitých infekcí byla nejčastější kombinace OYDV spolu s GCLV a SLV, což také souhlasí s výsledky autorů Smékalová a kol. (2010).

Jak je patrné z výsledků testování odrůdy 'Unikát', častěji vyskytující se skupinou virů byl rod *Carlavirus*, SLV byl přítomen téměř v celém souboru testovaných rostlin, GCLV u 57 % testovaného souboru. Kombinace přítomnosti obou sledovaných zástupců tohoto rodu (GCLV a SLV) byla také vůbec nejčastější vyskytující se kombinací. Vysokou míru přítomnosti viru SLV v rostlinách česneku v České republice potvrzují ve svých pracích také Klukáčková a kol. (2007) a Smékalová a kol. (2010). Vysoký výskyt virů SLV a GCLV je potvrzen také v Německu (Senula, 2000), Indii,

Indonésii, Koreji a Nepálu (Barg a kol., 1994). V rozmezí 23 % až 98 % byl GCLV detekován v Jižní Itálii (Dovas a Volvas, 2003). Naopak u česneku importovaného z Číny Klukáčková a kol. (2007) nezjistili přítomnost viru GCLV a u česneku importovaného ze Španělska, nebyla potvrzena přítomnost viru SLV. Také na jihu Itálie byl SLV detekován pouze u několika vzorků z testovaného souboru. Nízký výskyt virů rodu *Carlavirus* potvrzuje z Brazílie také Mituti a kol. (2011) a Mituti a kol. (2015) a nízký výskyt viru GCLV byl pozorován u rostlin z Tchaj-wanu a Thajska (Barg a kol., 1994). V Mexiku byly GCLV a SLV detekovány ve 32 % a 21 % testovaného souboru (Pérez-Moreno a kol., 2006). Daniels (1999) detekoval GCLV na izolátech z Brazílie a Číny v míře do 4 %.

Přítomnost patogenů rodu *Potyvirus* byla dle výsledků této práce oproti rodu *Carlavirus* u genotypu 'Unikát' nižší. V testovaném souboru byl vir OYDV přítomen u 43 % izolátů a vir LYSV u 35 %. Nižší výskyt rodu *Potyvirus* ve srovnání s rodem *Carlavirus* v České republice potvrzuje také Klukáčková a kol. (2007). Nízkou frekvenci viru OYDV (do 40 %) ve svých pracích zjistili také Daniels (1999), Fajardo a kol. v Brazílii, (2001) a Takaichi a kol. (1998) v Japonsku. V kontrastu k těmto výsledkům udává Van Dijk (1993), že je četnost výskytu rodu *Potyvirus* u česneku vyšší než rodu *Carlavirus*, a to z důvodu efektivnějšího přenosu virů. To je potvrzeno také autory Mituti a kol. (2015) z Brazílie a Dovas a kol. (2001b), kteří zjistili, že OYDV a LYSV jsou nejrozšířenější virové patogeny česneku v Řecku. Dovas a Volvas (2003) potvrzují přítomnost OYDV u 98 % testovaného souboru česneku a LYSV u 83 % v Jižní Itálii, Sutarya a Van Dijk (1994) 87% výskyt OYDV a 19% výskyt LYSV na ostrově Jáva v Indonésii.

Rozdílnosti ve výskytu virů jak rodu *Carlavirus*, tak *Potyvirus* mohou být způsobeny odlišnými geografickými podmínkami, ve kterých je česnek pěstován, ale i jeho původem. Jak uvádí Fritsch a Friesen (2002), je česnek kuchyňský dělen, mimo jiné dle svého geografického původu, do pěti odlišných skupin. Vliv na výskyt infekcí mohou mít také jednotlivé odrůdy česneku. Například Klukáčková a kol. (2007) zjistili, že v pěti testovaných českých odrůdách, dodaných stejným producentem, byly dvě odrůdy prokazatelně méně infikovány, naopak jedna odrůda byla infikována více souborem virů OYDV, LYSV, SLV a GCLV. Zajímavé jsou také výsledky práce Klukáčková a kol. (2004), kde bylo zjištěno, že napadení česneku pocházejícího od

českých producentů bylo významně nižší u česneku z Oddělení genové banky a importovaného česneku z Číny.

### 6.3 Porovnání testování metodou ELISA a RT-PCR

Pro tuto část experimentu bylo vybráno sto rostlin česneku kuchyňského odrůdy 'Lukan' kultivovaného *in vitro*, u kterých byla zjišťována přítomnost virových patogenů OYDV, LYSV, GCLV a SLV. Jednotlivé rostliny byly testovány nejprve sérologickou metodou ELISA a následně molekulárně-genetickou metodou RT-PCR.

Výsledky obou metod detekce byly porovnány a jak je patrné z výsledů, metoda RT-PCR byla schopna detekovat prokazatelně více pozitivních vzorků u tří ze čtyř testovaných virů (kromě SLV). Vyšší citlivost molekulárních metod potvrzují další autoři, jako např. Lunello a kol. (2004) a Sanjeev a kol. (2007). Dovas a kol. (2001a) uvádí citlivost metody až  $10^2 - 10^4$  krát vyšší než ELISA. Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova (2011) testovaly 50 genotypů česneku. Jejich výsledky potvrzují přítomnost OYDV v 54 % testovaných rostlin při použití detekční metody ELISA, metodou Real-Time RT-PCR bylo ovšem detekováno 100 % pozitivních rostlin. U viru LYSV bylo ELISA metodou detekováno 42 % pozitivních rostlin, metodou Real-Time RT-PCR 62 % pozitivních rostlin.

Kromě vyšší citlivosti je další výhodou PCR možnost navržení primerů se širším detekčním spektrem než jsou antiséra, menší časová náročnost RT-PCR, nižší riziko kontaminací (Dovas a kol., 2001a) a nižší gramáž materiálu, který je pro testování potřebný, což je u rostlin kultivovaných *in vitro* podstatné (Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova, 2011).

Jako nevýhodu molekulárních metod uvádí Lunello a kol. (2005) vysoké finanční náklady. Náklady spojené s detekcí virů v laboratořích Mendeleum-ústavu genetiky (vyjma nákladů spojených s lidskou prací) ovšem vycházejí přibližně ve stejné hodnotě, jako náklady spojené s testováním metodou ELISA. Další nevýhodou molekulárních metod mohou být špatně navržené primery. To dokladuje práce Klukáčková a kol. (2004). Materiál pocházející z Oddělení genové banky, supermarketu a od českých pěstitelů byl testován na přítomnost viru OYDV. Dle ELISA testu byl vir dle původu přítomen v 92 %, 100 % a 53 %. Pro RT-PCR byly použity různé primery – OYD-UP/OYD-DW- zde byl vir detekován v 88 %, 100 % a 53 % a primery OL2/OR1 – zde byla přítomnost viru 0,2 %, 0 % a 0 %. V tomto případě byla metodou ELISA

detekována vyšší četnost výskytu viru OYDV. Jak uvádí Klukáčková a kol., (2004), důvodem vyšší citlivosti metody ELISA může být variabilita sekvencí kódujících obalový protein mezi různými izoláty viru OYDV, především mezi izoláty evropskými a asijskými.

## **6.4 Eliminace virů u česneku kuchyňského**

### **6.4.1 Chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou**

#### a) odrůda 'D'Alsace Freres'

V této práci byly studovány a hodnoceny účinky tří antivirotik, acyclovir, rimantadin a zidovudin pro eliminaci rostlinných virů zřídka používaných. Jak je patrné z výsledků, u genotypu 'D'Alsace Freres', u kterého byla antivirotika aplikována ve fázi mladých rostlin kultivovaných *in vitro*, bylo použití rimantadinu v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> nejeфекtivnější. Rimantadin přitom dle dostupných literárních zdrojů nebyl zatím pro účely eliminace rostlinných virových patogenů vůbec použit. Jelikož ale byly rostliny dále předány spolupracující organizaci, nebylo možné je později přetestovat zavedenými metodami RT-PCR. Pokud by k testování došlo, je možné, že procento rostlin s eliminovanými viry by bylo nižší.

#### b) odrůdy 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo'

Aplikace antivirotik do média určeného pro kultivaci izolovaných růstových vrcholů v této práci nebyla úspěšná. Z celkového počtu 316 izolovaných růstových vrcholů u odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' byla další kultivace úspěšná pouze u 11 rostlin. Neregenerovaly ani explantáty varianty bez použití antivirotik (prostá izolace meristému).

Důvodem mohla být vysoká citlivost mladých explantátů na relativně vysoké koncentrace antivirotik. Tento závěr by korespondoval s výsledky publikace Senula a kol. (2000), pokud by ovšem růstové vrcholy varianty bez antivirotik regenerovaly. Senula a kol. (2000) zjistili, že po šestitýdenním působení ribavirinu aplikovaného v médiu pro meristémy byla regenerace rostlin redukována, nicméně eliminaci virů byla efektivní. Použitím 100 mg.l<sup>-1</sup> ribavirinu bylo dosaženo 100 % viru prostých jedinců,

rostliny byly ale díky působení ribavirinu hyperhydratované a již nepoužitelné. Tento fakt u česneku ale nepotvrzuje studie Ramírez-Malagón a kol. (2006), kde při ošetření ribavirinem nedošlo ke snížené regeneraci mladých rostlin.

Toxicitu a špatnou regeneraci explantátů různých druhů rostlin po aplikaci vyšších koncentrací antivirotik v kultivačních médiích sledovali také např. Vescan a kol. (2011). Pozorovali, že explantáty švestky po aplikaci ribavirinu (50 nebo 100 mg.l<sup>-1</sup>) normálně regenerovaly až tři měsíce po ošetření. Stevenson a Monette (1983) pozorovali fytoxicitu ribavirinu při použití koncentrace 40 až 50 mg.l<sup>-1</sup> u révy. Toxicitu ribavirinu

u révy v koncentraci 120 μmol.l<sup>-1</sup> (přibližně 30 mg.l<sup>-1</sup>) potvrzuje také Guta a kol. (2011). Weiland a kol. (2004) sledovali po aplikaci 20 mg.l<sup>-1</sup> acycloviru u révy negativní vliv na růst stonků a kořenění a také zvýšený výskyt apikálních nekrot. Použití ribavirinu při stejné koncentraci mělo za následek zvýšené žloutnutí rostlin, ale rostliny byly méně oslabeny než při použití acycloviru. Pupola a kol. (2009) pozorovali při eliminaci virů použitím ribavirinu (30 mg.l<sup>-1</sup>) u jahodníku prokazatelně vyšší výskyt nekrot oproti kontrolní variantě i oproti dalším ošetřením (azacytidine a dicyanamide v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup>). V koncentraci látek acyclovir, zidovudin, amantadin, 5-bromouracil a 2-thiouracil nad 30 mg.l<sup>-1</sup> byl sledován inhibiční efekt a odumírání u rostlin chryzantém (Ram a kol., 2005). Sanjeev a kol. (2007) aplikovali pro eliminaci virů v citrusu Kinnow (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora) acyclovir, zidovudin, DHT, ribavirin nebo 2-thiouracil v koncentracích (5 až 25 mg.l<sup>-1</sup>). Všechny látky ve všech koncentracích měly negativní vliv na tvorbu výhonů a koncentrace 10 mg.l<sup>-1</sup> a vyšší snižovaly úspěšnost roubování. Nepublikované výsledky na Mendeleum-ústavu genetiky také potvrzují negativní vliv dlouhodobého působení ribavirinu v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> na podnožové odrůdy ovocných dřevin.

Danci a kol. (2012) zkoumali vliv ribavirinu a jeho koncentrace (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg.l<sup>-1</sup>) na redukci virů u bramboru. Koncentrace od 40 mg.l<sup>-1</sup> způsobovaly fytoxicitu, ale použití koncentrace 35 mg.l<sup>-1</sup> bylo pro eliminaci virů efektivní a nemělo negativní vliv na rostliny. Naopak Faccioli a Colalongo (2002) nepozorovali ani při osmi týdenním působení 100 mg.l<sup>-1</sup> DHT s 50 mg.l<sup>-1</sup> ribavirinu na rostliny odrůd bramboru negativní vliv těchto látek. Negativní účinek působení ribavirinu (20 mg.l<sup>-1</sup>) u odrůd broskvoně a meruňky nepozorovali ani Křižan a kol. (2013) nebo Hauptmanova a Polak (2011) u švestky a meruňky (5 až 10 mg.l<sup>-1</sup>).

Příčinou téměř nulové regenerace rostlin česneku nemohlo být teoreticky ani špatně připravené médium. Médium bylo připravováno průběžně dvěma osobami, stejně tak např. zásobní roztoky. Není tedy příliš pravděpodobné, že by bylo médium chybně namícháno zároveň dvěma osobami. Mikrobiální infekce u těchto růstových vrcholů přitom pozorovány téměř nebyly. Experiment byl zakládán od půlky října do půli února, tedy v nevhodnějším termínu. Je možné, že sledované odrůdy česneku nebyly vhodné pro kultivaci *in vitro*. Nevhodnost některých odrůd pro kultivaci v aseptickém podmínkách jsme zjistili také v rámci projektu NAZV QH71228: „Ozdravení domácích genotypů česneku za účelem jejich uchování metodou kryokonzervace“, který byl v *in vitro* laboratoři ZF MENDELU řešen v letech 2007 až 2012.

c) U odrůdy 'Unikát' byla antivirotika aplikována do média pro primární kultury česneku (tzn. celé, desinfikované stroužky). Tato metoda aplikace antivirotik byla ověřena jako účinná v průběhu řešení výše zmíněného projektu NAZV. Také Senula a kol. (2000) uvádí tuto metodu jako možnou alternativu v případě špatné regenerace příliš malých explantátů. Při působení acycloviru, rimantadinu nebo zidovudinu po dobu dvou týdnů v koncentracích 25 nebo 50 mg.l<sup>-1</sup> nebyl pozorován negativní vliv antivirotik na růst rostlin primárních kultur a negativní vliv nebyl pozorován ani u regenerujících izolovaných růstových vrcholů ve srovnání s kontrolou. U nezregenerovaných růstových vrcholů byly příčinou neúspěchu převážně mikrobiální kontaminace, případně narušení explantátu pracovními nástroji při manipulaci.

Pozitivní účinek rimantadinu na eliminaci virů pozorovaný u odrůdy 'D'Alsace Freres' byl potvrzen také v případě eliminace viru OYDV u odrůdy 'Unikát', prokazatelně méně byl tento vir eliminován pouze variantou Z25. Naopak eliminace viru GCLV byla oběma koncentracemi rimantadinu prokazatelně nižší než u všech ostatních variant. Eliminace viru LYSV byla nejefektivnější použitím zidovudinu v obou koncentracích. Zidovudin by přitom vzhledem k popisovanému mechanismu účinku neměl na rostlinné viry příliš účinkovat. Je možné, že jeho účinek nemusí být cílen pouze na reverzní transkriptátu retrovirů, ale i na jiné enzymy důležité v životním cyklu rostlinných RNA virů. Pro eliminaci viru SLV byla prokazatelně nejefektivnější varianta A25. Úspěšnost eliminace viru SLV byla ve srovnání s ostatními viry nejnižší.



Pro eliminaci celého komplexu sledovaných virů bylo jako neúčinnější vyhodnoceno použití acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup>. Použitím této látky bylo dosaženo 81 % sledovaných virů prostých rostlin. Aplikaci acycloviru lze doporučit také z pohledu praktického a ekonomického. Látky rimantadin a zidovudin bylo na trhu problematické obstarat a v porovnání s acyclovirem (nebo např. ribavirinem) jsou tyto dvě látky přibližně dvacetkrát nákladnější.

V literatuře se zatím neobjevily publikace o eliminaci virů u česneku kuchyňského použitím jiného antivirotika než ribavirinu. Ribavirin lze komerčně pořídit za přibližně stejnou cenu jako acyclovir. Jeho účinnost pro eliminaci virových patogenů u česneku byla potvrzena např. Křížanem a kol. (2010), kteří dosáhli koncentrací 25 mg.l<sup>-1</sup> v kombinaci s meristémovými kulturami 47 až 89 % ozdravených rostlin. Nejproblematictější přitom byla eliminace viru GLCV. Z pohledu eliminace hodnotí vir GCLV jako nejobtížnější také Klukáčková a kol. (2004), Naušová a kol., (2008) a Senula a kol. (2000).

Naopak Ramírez-Malagón a kol. (2006) vyhodnotil použití ribavirinu v 205 μM koncentraci (což je 50 mg.l<sup>-1</sup> při molární hmotnosti ribavirinu 244,2 g.mol<sup>-1</sup>) při úspěšnosti ozdravení 27 % a 34,8 % jedinců u dvou odrůd česneku jako neefektivní. Senula a kol. (2000) pozorovali po šestitýdenním ošetření ribavirinem v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup> a 50 mg.l<sup>-1</sup> s kombinací meristémových kultur významnou redukci virů GCLV a SLV, ovšem u virů OYDV a LYSV nebylo ošetření efektivní. Po šestitýdenním ošetření ribavirinem s kombinací meristémových kultur vyhodnotili Sidaros a kol. (2004) eliminaci virů u dvou odrůd česneku jako 100%.

Výsledky této práce ovšem podporují publikace zabývající se eliminací virových patogenů stejných rodů. V práci Caner a kol. (1985) in Ram a kol. (2004) byl zjištěn inhibiční efekt acycloviru na vir *Bean golden mosaic virus* (rod *Potyvirus*) infikující *Phaseolus lunatus*. Koncentraci acycloviru 30 mg.l<sup>-1</sup> pro eliminaci viru *Chrysanthemum B carlavirus* (rod *Carlavirus*) hodnotil kolektiv autorů Ram (2005) jako třetí nejefektivnější po ošetření 2-thiouracilem (40 mg.l<sup>-1</sup>) a zidovudinem (35 mg.l<sup>-1</sup>). Tyto výsledky jsou ale v kontrastu s dalšími autory, zabývajícími se stejnými rody virů. Nulový efekt acycloviru na eliminaci rostlinných virů ve svých pracích publikují Park a kol. (1994) u viru *Potato virus S* (rod *Carlavirus*) a Vcelar a kol. (1992) u viru *Ornithogalum mosaic potyvirus* (rod *Potyvirus*). Kolektivu autorů Sanjev (2007) se

podářilo při eliminaci viru *Indian citrus ringspot virus* (rod *Mandarivirus*) dosáhnout 37 % viru prostých rostlin při použití ribavirinu, 21,4 % 2-thiouracilu a 20,8 % acycloviru v koncentracích 25 mg.l<sup>-1</sup>. Ošetření zidovudinem a DHT nebylo efektivní.

Také Weiland a kol. (2004) uvádí, že ošetření acyclovirem v koncentraci 20 mg.l<sup>-1</sup> nebylo v případě eliminace viru GFLV (rod *Nepovirus*) efektivní. Autorům Navacchi a kol. (2005) se použitím acycloviru v kombinaci s ribavirinem, termoterapií a meristémovými kulturami také nepodařilo dosáhnout zdravých jedinců artyčoku (*Artichoke latent virus*, rod *Nepovirus*).

#### **6.4.2 Kontrolní varianta (meristémové kultury)**

V porovnání s některými variantami chemoterapie lze konstatovat, že eliminace virů prostou meristémovou kulturou byla u česneku odrůdy 'Unikát' úspěšná. U eliminace komplexu čtyř studovaných virů byla tato metoda statisticky prokazatelně méně účinná pouze v porovnání s variantou acycloviru (25 mg.l<sup>-1</sup>). Ani u jednoho viru ovšem nebylo dosaženo pomocí této metody nejlepších výsledků. Vzhledem k relativně nízké ceně acycloviru je proto pro eliminaci komplexu virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV vhodnější použití chemoterapie v kombinaci s meristémovou kulturou.

V této práci byla regenerace izolovaných explantátů s velikostí 0,8 mm průměrně 63 %. V minulosti probíhaly na ústavu Mendeleum experimenty s velikostí explantátu, ovšem při velikostech menších jak 0,8 mm docházelo k velmi nízké regeneraci (nepublikované výsledky). Keller a Senula (2003) uvádí jako nejdůležitější faktor úspěšné eliminace virů u česneku pomocí meristémových kultur právě velikost explantátu. Pouze u explantátů velikosti 0,3 až 0,5 mm dosáhli 26,7 % viru prostých jedinců, při velikosti 2 až 3 mm byla úspěšnost eliminace prokazatelně nižší. Na druhou stranu je regenerace a následný růst explantátů o velikosti 1 mm výrazně lepší, kolem 90 až 100 % (Senula a kol., 2000). Což nepotvrzuje Conci a kol. (2005), kteří dosáhli při velikosti explantátu 0,3 mm 80 až 90% regenerace. Sidaros a kol. (2004) naopak hodnotili velikosti explantátů 1, 3 nebo 5 mm. Nejlepší regenerace byla pozorována u velikosti 5 mm, ovšem bez efektu eliminace virů. Té bylo dosaženo při 3mm velkých explantátech ve 33,3 %.

Pomocí prosté meristémové kultury bylo v předkládané práci eliminováno přes 80 % patogenů rodu *Potyvirus* a vir *Garlic common latent virus*, více perzistentní byl vir SLV. Nižší úspěšnost v eliminaci patogenů rodu *Carlavirus* potvrzují také další autoři. Ondrušiková a kol. (2009) eliminovali komplex virů metodou meristémových kultur při velikosti explantátu 0,8 mm u 10 odrůd česneku. Autoři zjistili, že nejvíce perzistentní vir byl GCLV (úspěšnost eliminace pod 50 %), naopak v případě eliminace OYDV, LYSV a SLV byla úspěšnost vysoká (v průměru 70 až 80 %). Senula a kol. (2000) izolovali apikální meristémy s jedním primordiem o velikosti 0,3 až 0,8 mm. Dle testování bylo první rok průměrně ozdraveno 37,7 % rostlin, ve druhém roce byl již počet ozdravených jedinců nižší (26,6 %). Nejčastěji se vyskytujícím virem u pozitivních vzorků byl GCLV, kolem 50 %.

Conci a kol. (2005) potvrzují vysokou úspěšnost eliminace virů OYDV a LYSV použitím meristémových kultur u většiny sledovaných odrůd. Metodou meristémových kultur dosáhli Ramírez-Malagón a kol. (2006) úspěšnost 64 % v eliminaci virů OYDV a LYSV. Bruna (1997) izolovala meristémy česneku chilského kultivaru 'Rosado-INIA' o velikosti 0,5 až 0,8 mm, ošetřením bylo získáno 65 % OYDV prostých rostlin.

Pateña a kol. (2005) provedli izolaci meristému dvakrát u jednoho jedince. Po první preparaci (15 až 20 mm x 1,5 mm) byla většina jedinců pozitivní na přítomnost virů, po druhé preparaci (0,3 až 0,5 mm) se jim podařilo ozdravit 75 % vzorků od virů OYDV, LYSV, GCLV a SLV.

Dle výsledků a prostudované literatury závisí úspěšnost eliminace virových patogenů česneku nejen na velikosti izolovaného explantátu, ale také na odrůdě česneku. Obecně lze ovšem konstatovat, že velikost explantátů 0,8 až 1 mm je vhodná jak z pohledu eliminace virových patogenů, tak z pohledu regenerace rostlin.

## **6.5 Relativní kvantifikace viru *Garlic common latent virus* (Real-Time PCR)**

Nad rámec původní metodiky byl do práce zařazen experiment detekce viru GCLV metodou Real-Time PCR. Dle výsledků studované literatury je vhodné potvrzení negativních reakcí další metodou detekce (Leisova–Svobodova a Karlova–Smekalova, 2011; Lunello a kol., 2004; Sanjeev a kol., 2007). Jelikož je metoda ELISA, která je na pracovišti Mendeleum pro detekci virových patogenů česneku zavedena, časově náročnější a vyžaduje větší množství rostlinného materiálu, chtěla jsem v této práci pro

potvrzení negativity aplikovat metodu Real-Time PCR. Dalším důvodem pro zvolení této metody byla možnost detekce virových patogenů z izolátů, které jsou uloženy v hluboko mrazicím boxu ve formě RNA. Dlouhodobá kultivace česneku v *in vitro* podmínkách není zcela úspěšná a v průběhu kultivace dochází k výpadkům rostlin a všechny rostlinné vzorky již nemusí být k dispozici.

Jelikož se vir GCLV jeví jako nejobtížněji redukovatelný (Klukáčková a kol., 2004; Ondrušiková a kol., 2009; Senula a kol., 2000), byla relativní kvantifikace započata právě s tímto virem. Dle výsledků je patrné, že metoda relativní kvantifikace je citlivější než metoda reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce. Pokud by byly výsledky vyhodnoceny dle testování Real-Time PCR, byla by úspěšnost ozdravení prokazatelně nižší. Metoda chemoterapie s použitím acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> je ale i přes tento fakt hodnocena jako nejefektivnější.

Detekce virů OYDV, LYSV a SLV metodou Real-Time PCR již v této práci nebyla optimalizována a bude předmětem dalšího výzkumu.

## 7 ZÁVĚR

V disertační práci „Možnosti využití antivirotik v procesu eliminace virů u česneku kuchyňského“ byl studován vliv antivirotik acyclovir, rimantadin a zidovudin na eliminaci komplexu nejrozšířenějších virů u česneku. Sledována byla přítomnost virů *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus*, *Shallot latent virus* a *Garlic common latent virus*. První rok řešení byla antivirotika aplikována do média pro multiplikaci česneku. Rostliny, které byly podrobeny ošetření, byly mladé rostliny odrůdy 'D'Alsace Freres' regenerované z izolovaných růstových vrcholů, u kterých byla před začátkem experimentu metodou ELISA detekována přítomnost všech čtyř sledovaných virových patogenů. Dle výsledků testování metodou ELISA byla nejefektivnější variantou pro eliminaci sledovaného komplexu virů aplikace rimantadinu v koncentraci 50 mg.l<sup>-1</sup> a po dobu působení dvou týdnů.

V disertační práci byl pozorován také vliv chemoterapie na izolované rostlinné vrcholy velikosti 0,8 mm u odrůd 'Blanin', 'Sukoradský' a 'Japo' pocházejících z Oddělení genové banky VÚRV v.v.i. v Olomouci. Nicméně ani u jedné odrůdy nedošlo téměř k žádné regeneraci explantátů, a to ani u kontrolní varianty (prosté meristémové kultury bez použití antivirotik). Vzhledem k opakovaným problémům u tří odrůd, byla tato metoda vyhodnocena jako nevhodná, a to v kontrastu s výsledky některých dalších autorů, kteří se eliminaci virů u česneku ve svých publikacích věnovali. Na druhou stranu se mnoho publikací shoduje s jedním z vysvětlení tohoto jevu, a to, že vliv na úspěšnost kultivace má také odrůda.

V dalších letech experimentu byla chemoterapie aplikována na očištěné, povrchově desinfikované stroužky česneku odrůdy 'Unikát' dodané firmou Moravoseed CZ a.s. Po dvoutýdenním působení následovala izolace explantátů velikosti 0,8 mm. Tato metoda aplikace chemoterapie byla vyhodnocena jako efektivní a je možné ji doporučit jako postup chemoterapie pro česnek kuchyňský. Regenerované rostliny byly následně testovány metodou RT-PCR, přičemž metoda byla pro detekci viru *Garlic common latent virus* optimalizována, a to včetně navržení primerů. Po vyhodnocení detekce bylo zjištěno, že nejefektivnější varianta pro eliminaci komplexu virů u česneku odrůdy 'Unikát' byla s použitím acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> (A25). Tato varianta byla nejefektivnější i u viru *Shallot latent virus*, který byl celkově nejméně eliminován. Účinek rimantadinu byl sice v případě eliminace rodu *Potyvirus*

u odrůdy 'Unikát' téměř porovnatelný s acyclovirem, ale pro eliminaci rodu *Carlavirus* již tento účinek potvrzen nebyl. V porovnání s ostatními variantami je použití acycloviru také výrazně ekonomičtější. Pro eliminaci virů u česneku kuchyňského je tedy nejúčinnější aplikace acycloviru v koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> v kombinaci s meristémovou kulturou. Pro další výzkum by bylo vhodné snižovat koncentrace antivirotik v médiu a naopak zvyšovat dobu působení, jak je v literatuře uvedeno např. u ribavirinu.

Z důvodů potvrzení výsledků testování metodou RT-PCR, resp. pro ověření skutečné negativity izolátů na přítomnost virových patogenů, byla pro tuto detekci na pracovišti Mendeleum optimalizována metoda Real-Time PCR. Jelikož literatura uvádí vir GCLV jako nejobtížněji odstranitelný vir v česneku, byla metoda optimalizována právě pro něj. Ze získaných výsledků, stejně tak jako z výsledků prezentovaných v různých literárních zdrojích, vyplývá, že úspěšnost eliminace virové infekce je silně závislá od použitého systému pro detekci daných virů. Jak se v průběhu disertační práce tyto metody zdokonalovaly, procento ozdravených rostlin klesalo. Jak je patrné z výsledků, metodou Real-Time PCR bylo detekováno více virových infekcí než metodou RT-PCR. Pro detekci viru GCLV u česneku lze tedy pro možné potvrzení či vyvrácení jeho přítomnosti doporučit detekci pomocí Real-Time PCR. Vzhledem k pozorovaným vlastnostem detekčního systému Real-Time PCR pro GCLV by bylo vhodné soustředit se v následném období na navržení podobných systému na detekci dalších tří sledovaných virů.

## 8 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ

- AGRIOS, G., N. 2005. *Plant pathology*. 5th edition. Burlington. Elsevier Academic Press. 922 s. ISBN: 978-0-12-044565-3.
- ALMAARRI, K., MASSA, R., A ALBISKI, F. 2012. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. *Plant Biotechnology*. 29(3), 237 – 243. ISSN 1347-6114.
- ARYA, M., BARANWAL, V., K., AHLAWAT, Y., S., A SINGH, L. 2006. RT-PCR detection and molecular characterization of Onion yellow dwarf virus associated with garlic and onion. *Current Science*, 91(9), 1230 – 1234. ISSN 0011-3891.
- ASTIER, S. 2007. *Principles of plant virology*. Effield: Science Publishers. 472 s. ISBN 2-7380-0937-9.
- BAI, Y., ZHANG, W., LI, X., SHEN, Y., GAO, Y., FAN, G., GENG, H. A MENG, X. 2010. Advances in Research of Garlic Virus Diseases. *Journal of Northeast Agricultural University*. 17(2), 85 – 92. ISSN 1006-8104.
- BALTIMORE, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 35(3), 235 – 41. ISSN 0005-3678.
- BARG, E., LESEMANN, D., E., VETTEN, H., J. A GREEN S., K. 1997. Viruses of alliums and their distribution in different Allium crops and geographical regions. *Acta Hort.* 433, 607 – 616. ISSN 2406-6168.
- BARG, E., LESEMANN, D., E., VETTEN, H., J., GREEN, S., K. 1994. Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting Allium crops in South and South-east Asian countries. *Acta Hort.* 358, 251 – 258. ISSN 2406-6168.
- BAUDYŠ, E. 1935. *Hospodářská fytopathologie*. VŠZ, Brno, 624 s.
- BAYATI, S., SHAMS-BAKHSH, M. A MOINI, A. 2011. Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 13, 442 – 450. ISSN 2345-3737.

- BERNAL, J. D., A FANKUCHEN I. 1937. Structure types of protein 'crystals' from virus-infected plants. *Nature* (London) 139, 923 – 924. In: HULL, R. 2004. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier: USA. ISBN 0-12-361160-1.
- BERTACCINI, A., BOTTI, S., TABANELLI, D., DRADI, G., FOGHER, C., PREVIATI, A. A DA RE, F. 2004. Micropropagation and establishment of mite-borne virus-free garlic (*Allium sativum*). *Acta Hort.* 631, 201 – 206. ISSN 2406-6168.
- BERTI, N. A RAPILLY M. 1976. Faune d'Iran. List d'especes et revision du genre *Lilioceris* Reitter (Col. Chrysomelidae). *Annales de la Société Entomologique de France* (Nouvelle série), 12, 31 – 73. ISSN 2168-6351.
- BEZIĆ, N., DUNKIĆ, V. AELMA, V. 2013. Antiphytoviral Activity of Essential Oils of Some Lamiaceae Species and There Most Important Compounds on CMV and TMV. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. s. 982 – 988. Formatex Research Center. ISBN 978-84-942134-0-3.
- BEZIĆ, N., VUKO, E., DUNKIĆ, V., RUŠČIĆ, M., BLAŽEVIĆ, I. A BURČUL, F. 2011. Antiphytoviral activity of sesquiterpene-rich essential oils from four Croatian *Teucrium* species. *Molecules*. 16(9), 8119 – 8129. ISSN 1420-3049.
- BIELSKA, I., 1975. Parametry demigraficzne *Rhizoglyphus echinopus* (E i R) i *Rhizoglyphus robini* C. w zaleznosci od temperatury, wilgotnosci i pozywienia. *Zesz. probl. Post. Nauk roln.* 171, 179 – 188. ISSN 0084-5477.
- BISHOP, C., D. 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaluca alternifolia* (Maiden & Betche) cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J. Essent. Oil Res.* 7, 641-644. ISSN 2163-8152.
- BLATTNÝ, C. 1961. La variabilité du niveau du virus de la jaunisse chez *Allium ampeloprasum* L. subsp. *Porrum* L. (Regel.). *Biol. Plant. Praha.* 3, 34 – 38.
- BLOCK, E. 2010. Garlic and other Alliums: The lore and the science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 480 s. ISBN: 978-1-84973-180-5.



- BOS, L. 1981. Leek yellow stripe virus. *Descriptions of Plant Viruses*. Association of Applied Biologists. 240, 4.
- BOS, L. 1982. Viruses and virus diseases of *Allium* species. In: *IV Conference on recent Advances in Vegetable Virus Research*. 127, 11 – 30.
- BOS, L., HUIJBERTS, N., HUTTINGA, H., A MAAT, D., Z. 1978a. Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus; characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84(5), 185 – 204. ISSN 0028-2944.
- BOS, L., HUTTINGA, H. A MAAT, D., Z. 1978b. Shallot latent virus, a new carlavirus. *Neth. J. Plant Pathol.* 84, 227 – 237. ISSN 0028-2944.
- BOWN, D. 2002. *The Royal Horticultural Society. New Encyclopedia Herbs a Their Uses*. 2. vydání, London: Dorling Kindersley. 448 s. ISBN 0-7513-3386-7.
- BRČÁK, J. 1975. Garlic mosaic virus particles and virus infections of some wild *Allium* species. *Ochr. Rostl.* 11, 237 – 242.
- BREMER, H. 1937. Uber die bisher falschlich „Zwiebelroz“ genannte Gelbstreifigkeit an Zwiebelsamentragern. *Phytopath. Z.* 10, 79 – 105.
- BREWSTER J., L. 2008. *Onions and Other Vegetable Alliums*. 2nd edition. No. 15. CABI. 454 s. ISBN 978-1-84593-399-9.
- BRISON, M., BOUCAUD, M., T., PIERRONNET, A., DOSBA, F. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Sci.* 123, 189 – 196. ISSN: 0168-9452.
- BRUNA, A. 1997. Effect of thermotherapy and meristem-tip culture on production of virus-free garlic in Chile. *Acta Hort.* 433, 631 – 634. ISSN 2406-6168.
- CACIAGLI, P. 2008. Vegetable Viruses. In: MAHY, B., V., J. A VAN REGENMORTEL M., H., V. 2010. *Desk Encyklopedia of Plant And Fungal Virology*. Academic press. Elsevier (USA). ISBN 978-0-12-375148-5.

- CAFRUNE, E., PEROTTO, M., C. A CONCI, V., C. 2006. Effect of Two Allxivirus Isolates on Garlic Yield. *Plant Disease* 90(7), 898 – 904. ISSN 0191-2917.
- CANAVELLI, A., NOME, S., F. A CONCI, V., C. 1998. Efecto de distintos virus en la producción de ajo (*Allium sativum*) Rosado Paraguayo. *Fitopatol. Bras.* 23, 354 – 358. ISSN 1678-4677.
- CANER, J., DE FAZIO, G., ALEXANDRE, M., A., V., KUDAMATSU, M., AVICENTE, M. 1985. Acao dos quimicoterapicos antivirais no control do virus do mosaico dourado do feijoeiro, em *Phaseolus lunatus*. *Arg. Inst. Biol.* 52, 1 – 4, 39-43.
- CELLI, M., G., TORRICO, A., K., KIEHR, M., CONCI, V., C. 2013. Striking differences in the biological and molecular properties of onion and garlic isolates of onion yellow dwarf virus. *Archives of virology*, 158(6), 1377 – 1382. ISSN 1432-8798.
- CIEŚLIŃSKA, M. 2007. Application of thermo- and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 15, 117 – 124.
- CONCI, V., C., HELGUERA, M., A NOME, S., F. 1999. Serological and biological comparison of onion yellow dwarf virus from onion and garlic in Argentina. *Fitopatol. Bras.* 24, 73 – 75. ISSN 1678-4677.
- CONCI, V., C., LUNELLO, P., BURASCHI, D., ITALIA, R., R., A NOME, S., F. 2002. Variations of Leek yellow stripe virus concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease.* 86(10), 1085 – 1088. ISSN 0191-2917.
- CONCI, V., C., PEROTTO, M., C., CARFUNE, E. A LUNELLO, P. 2005. Program for Intensive Production of Virus-Free Garlic Plants. *Acta Hort.* 677, 195 – 200. ISSN 2406-6168.
- Česnek kuchyňský. *MoravoSeed*. [online]. © 2010 – 2015 [cit. 2015-10-20]. Dostupné z: <http://moravoseed.cz/index.php?stranka=sortiment&kategorie=1&druh=22>

- DANCI, M., DANCI, O., MIKE, L., BACIU, A., OLARU, D., PETOLESCU, C., BERBENTEA F., DAVID I. 2012. Production of virus free potato plantlets. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 16(1), 232 – 238.
- DANIELS, J., 1999. Occurrence of viruses in garlic in the state of Rio Grande de Sul. *Brazil. Fitopatol. Brasil*. 24(1), 91. ISSN 0100-4158.
- DELECOLLE, B. A LOT, H. 1981. Identification of three viruses infected garlic by immunoelectronmicroscopy. *Agronomie*. 1, 763 – 770.
- DIEKMANN, M. 1997. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 18. *Allium spp.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. ISBN 92-9043-346-9.
- DOVAS, C., I. A VOVLAS, C. 2003: Viruses infecting *Allium spp.* In Southern Italy. *J. Plant Pathol.* 85, 135. ISSN 0028-2944.
- DOVAS, C., I., HATZILOUKAS, E., SALOMON, R., BARG, E., SHIBOLETH, Y. A KATIS, N., I. 2001a. Comparison of methods for virus detection in *Allium spp.* *Journal of Phytopathology*. 149, 731 – 737. ISSN 1439-0434.
- DOVAS, C., I., HATZILOUKAS, E., SALOMON, R., BARG, E., SHIBOLETH, Y., A KATIS, N., I. 2001b. Incidence of viruses infecting *Allium spp.* in Greece. *European journal of plant pathology*. 107(7), 677 – 684. ISSN 1573-8469.
- DrugBank. DrugBank. [online]. 2015a. Updated on October 15, 2015 [cit. 2015-06-25]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00787>.
- DrugBank. DrugBank. [online]. 2015b. Updated on October 15, 2015 [cit. 2015-06-25]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00478>.
- DrugBank. DrugBank. [online]. 2015c. Updated on October 15, 2015 [cit. 2015-06-29]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00495>.
- DUNKIĆ, V., BEZIĆ, N., VUKO, E., CUKROV, D. 2010. Antiphytoviral Activity of *Satureja montana L. ssp. variegata* (Host) P. W. Ball Essential Oil and Phenol Compounds on CMV and TMV. *Molecules*. 15, 6713 – 6721. ISSN 1420-3049.

- EASTOP, V., F. A BLACKMAN, R., L., 2005. Some new synonyms in Aphididae (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Zootaxa*. 1089, 1 – 36. ISSN 1175-5334.
- EICHMEIER, A. 2013. Analýza variability genomů nepovirů (GFLV a ArMV) v produkčních vinicích vinařské oblasti Morava. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta.
- ELNAGAR, S., EL-SHEIKH, M., A., K. A ABD, A., S., E., D. 2009. Effect of natural infection with Onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt. *Journal of Life Sciences*. 5(8), 34 – 39.
- FACCIOLI, G. A COLALONGO, M., C. 2002. Eradication of Potato virus Y and Potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings (*Solanum tuberosum* L.). *Phytopathol. Mediterr.* 41, 76 – 78. ISSN 1593-2095.
- FAJARDO, T., V., M., NISHIJIMA, M., BUSO, J., A., TORRES, A., C. AVILA A., C. A RESENDE R., O. 2001. Garlic viral complex: identification of potyviruses and carlaviruses in Central Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 26, 619 – 626. ISSN 1678-4677.
- FERNÁNDEZ-CALVINO, L., FAULKNER, C., A MAULE, A. 2011. Plasmodesmata as active conduits for virus cell-to-cell movement. In: CARANTA C., et al. *Recent Advances in Plant Virology*, s. 47 – 74. ISBN 978-1-904455-75-2.
- FIDAN, H. A BALOGLU, S. 2009. First report of Garlic common latent virus in garlic in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91(4), 4.97 – 4.112.
- FLETCHER, P., J., FLETCHER, J., D., LEWTHWAITE, S., L. 1998. In vitro elimination of onion yellow dwarf and shallot latent viruses in shallots (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.). *New Zealand journal of crop and horticultural science*. 26(1), 23 – 26. ISSN 1175-8783.
- FRITSCH, R., M. FRIESEN, N. 2002. *Evolution, domestication and taxonomy*. In: RABINOWITCH, H., D., A CURRAH, L. *Allium crop science: recent advances*, s. 1 – 26. ISBN0-85199-510-1.

- GAWANDE, S., J., CHIMOTE, K., P., GURAV, V., S. A GOPAL, J. 2013. Distribution and natural incidence of Onion Yellow Dwarf virus (OYDV) on garlic and its related *Allium* species in India. *Indian Journal of Horticulture*, 70(4), 544 – 548. ISSN 0974-0112.
- GIECK, S., L., PAPPU, H. R., HAMM, P. B., & DAVID, N. L. 2007. First report of Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus, and Garlic common latent virus in garlic in Oregon. *Plant Disease*, 91(4), 461 – 461. ISSN 0191-2917.
- GNANN, J., W., BARTON, N., H. A WHITLEY, R., J. 1983. Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 3(5), 275 – 283. ISSN: 1875-9114
- GRAICHEN, K. A LEISTNER, H. U. 1987. Zwiebelgelbstreifen-Virus (onion yellow dwarf virus) verursacht Knoblauchmosaik. *Arch. Phytopathol. Pflanzensch.* 23, 165 – 168.
- GREBER, U., F., SINGH, I., A HELENIUS, A. 1994. Mechanisms of virus uncoating. *Trends in mikrobiology*. 2(2), 52 – 56. ISSN 0966-842X.
- GUTA, I., C., A BUCIUMEANU, E., C. 2011. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(5), 6535 – 3539. ISSN 1224 - 5984.
- HASSAN, H., T. 2004. Ajoene (natural garlic compound): a new anti-leukaemia agent for AML therapy. Elsevier Ltd. All rights reserved. *Leukemia Research* 28, 667–671. ISSN 0145-2126.
- HAUPTMANOVA, A. A POLAK, J. 2011. The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures. *Hort. Sci.* 38(2), 49 – 53. ISSN 1805-9333.
- HAVRÁNEK, P. 1972. Virus-free garlic clones obtained from meristem cultures. *Ochr. Rostl.* 8, 119 – 298.

- HAVRÁNEK, P., 1971: Occurrence of viruses in the genus *Allium* and virus-free clones of common garlic (*Allium sativum*). *Plant Virology, Proc. 7th Conf. Czechoslovak. Plant Virol.* 133 – 138.
- HAVRÁNKOVÁ, M. A HAVRÁNEK, P. 1987. Odvození viruprostých klonů československých odrůd česneku. *Bull. Výzk. a šlecht. úst. Zelin. Olomouc.* 31, 27 – 34.
- HEDERSON, W., J. 1935. Yellow dwarf, a virus disease of onions, and its control. *Res. Bull. Iowa Agric. Exp. Stn.* 188, 209-255. In: BOS, L. 1982. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta. Hortic.* 127, 11 – 29. ISSN 2406-6168.
- HIRSCH, M., S., SWARTZ, M., N. 1980. Drug therapy: antiviral agents. *New England Journal of Medicine.* 302, 949 – 953. ISSN 1533-4406.
- HORMOZI-NEJAD, M., H, MOZAFARI, J. A RAKHSHANDEHROO, F. 2010. Elimination of Bean common mosaic virus using an electrotherapy technique. *J. Plant. Dis. Prot.* 117, 201 – 205. ISSN 18613829.
- HORST R. K., COHEN D. 1980. Amantadine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of *Chrysanthemum stunt viroid*. *Acta Hort.* 110, 315 – 319. ISSN 2406-6168.
- CHEN, J., ADAMS, M., J., ZHENG, H., Y., CHEN, J., P. 2003. Sequence analysis demonstrates that Onion yellow dwarf virus isolates from China contain a P3 region much larger than other potyviruses. *Arch. Virol.* 148, 1165 – 1173.
- CHEN, J., CHEN, J. A ADAMS, M., J. 2001. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch. Virol.* 146, 1841 – 1853. ISSN 1432-8798.
- CHODORSKA, M., PADUCH-CICHAL, E., KALINOWSKA, E. A SZYNDEL, M. S. 2014. First Report of Onion yellow dwarf virus, Garlic common latent virus and Shallot latent virus on Garlic in Poland. *Plant Disease*, 98(6), 858 – 858. ISSN 0191-2917.

- ICTVdB Management. 2006a. 00.056.0.04. Carlavirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Dostupné z: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/ICTVdB/00.056.0.04.htm>
- ICTVdB Management. 2006b. 00.056.0.04.010. Garlic common latent virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. Dostupné z: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/ICTVdB/00.056.0.04.010.htm>
- International Committee on Taxonomy of Viruses. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. [online]. © 2014 [cit. 2015-02-11]. Dostupné z: <http://ictvonline.org/virusTaxInfo.asp>.
- IPGRI ECP/GR, AVRDC 2001. Descriptors for Allium (Allium spp.) International Plant Genetic Resources Institute, Rome, European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks. (ECP/GR). Taipei, Asian Vegetable Research and Development Center. 1 – 42.
- IWANOWSKI, D. 1892. Ueber die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bull. Acad. Imp. Sci. St.-Petersburg*. 3, 65-70. In: HULL, R. 2004. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier: USA. ISBN 0-12-361160-1.
- JAKAB-ILYEFALVI, Z. A PAMFILL, D. 2011. Results regarding the classical and modern pathogen elimination techniques of plum pox virus at plum (*Prunus Domestica*, L.). *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 16, 292 – 305. ISSN 15836258.
- JEFFRIES, D., J. 1989. Zidovudine resistant HIV. *The BMJ*. 298(6681), 1132 – 1133. ISSN 1756-1833.
- JUREVA, N., A. A KOKOREVA, V., A. 1992. *Mnogoobrazie lukov i ich ispolzovanie*, Moskva, 160 s. ISBN 5-7230-0170-1.
- KANG, S., G., KOO, B., J., KOO, LEE, E., T. A CHANG, M., U. 2007. Allexivirus Transmitted by Eriophyid Mites in Garlic Plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(11), 1833 – 1840. ISSN 1017-7825.

- KANICHI, M., HAMAYA, E., SHIMOMURA, T. A IKEGAMI, Y. 1969. Production of virus-free plants means of meristem culture. (With garlic, 11 of 25 explants grew to plantlets; the unidentifed mosaic virus seen eliminated). *J. Cent. Agr. Exp. Sta.* 13, 45 – 110.
- KANYUKA, K., V., VISHNICHENKO, V., K., LEVAY K., E. et al. 1992. Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexvirus and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *J. Gen. Virol.* 73, 2553 – 2560. ISSN 1465-2099.
- KATIS, N., I., MALIOGKA, V., I. AND DOVAS CH., I. 2012. Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. In LOEBENSTEIN G. A LECOQ H. (eds). 2012. *Advances in Virus Research*, Vol. 84, Burlington: Academic Press. 84, 163 – 208.
- KAUSCHE, G. A., PFANKUCH E. A RUSKA A. 1939. Die Sichtbormachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften.* 27, 292 – 299. In: HULL, R. 2004. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier: USA. ISBN 0-12-361160-1.
- KELLER, E., R., J., ZANKE, C., D., BLATTNER, F., R., KIK, C., STAVĚLÍKOVÁ, H., ZÁMEČNÍK, J., ESNAULT, F., KOTLIŇSKA, T., SOLBERG, S. A MICCOLIS, V. 2012. Establishment of a European Core Collection by Cryopreservation and Virus Elimination in Garlic. *Acta Hort.* 969, 319 – 327. ISSN 2406-6168.
- KHAN, J., A., DIJKSTRA, J. 2002. *Plant Viruses As Molecular Pathogens*. Food Product Press. 537 s. ISBN 1-56022-895-4.
- KLUKÁČKOVÁ, J., KLUKÁKOVÁ, J., NAVRÁTIL, M., A DUCHOSLAV, M. 2007. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic/Natürliche Infektion von Knoblauch (*Allium sativum* L.) durch Viren in der Tschechischen Republik. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 97 – 100. ISSN: 18613829.



- KLUKÁČKOVÁ, J., M. NAVRÁTIL, M. VESELÁ, P. HAVRÁNEK, D. ŠAFÁŘOVÁ, D. 2004. Occurrence of garlic viruses in the Czech Republic. *Acta Fytotechn. Zootechn.* 7, 126 – 128. ISSN 1336-9245.
- KÓŇA, J., KÓŇOVÁ, E. 2005): Cibul'ové zeleniny, Garmond Nitra, 1. Vydání. ISBN 80 - 89148 - 21 - 2.
- KOZÁK, J. 2015. Odrůdy česneku. *Šlechtění česneku. Ing. Jan Kozák.* [online]. [2015] [cit. 2015-10-20]. Dostupné z: <http://www.k-cesnek.cz/odrudy.php>.
- KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., KUDĚLKOVÁ, M., WASSERBAUEROVÁ, L., KRAJÍČKOVÁ, J., SMÉKALOVÁ, K. A DUŠEK, K. 2010. Metodika ozdravování česneku od virů pomocí kultivace meristému a in vitro kultur: certifikovaná metodika. Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-491-4.
- KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ E. A TRČKOVÁ, K. 2004. Metodika množení dřevitého indikátoru GF 305 metodou in vitro. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 53 s. ISBN 80-7157-803-7.
- KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., HOLLEINOVÁ, V., KUDĚLKOVÁ, M., HERRMANNOVÁ, E., MATEJKOVÁ, D., POLÁK, J. 2013. *Metodika ozdravování rostlin odrůd meruňky, broskvoně a slivoně pomocí chemoterapie v podmínkách in vitro.* Certifikovaná metodika. Mendelova univerzita Brno. ISBN 978-80-7375-837-0.
- KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., TRČKOVÁ K. 2004. *Metodika množení dřevitého indikátoru GF 305 metodou in vitro.* Odborná kniha. MZLU Brno. ISBN 80-7157-803-7.
- LAPORT, M., S., SANTOS, O., C., MURICY, G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology* 10(1), 86 – 105. ISSN 1389-2010.
- LARSEN, F. 2015. Aciclovir. DermNet NZ. [online]. © 2015 [cit. 2015-06-24]. Dostupné z: <http://www.dermnetnz.org/treatments/aciclovir.html>.

- LARSON, R. A WALKER, J., C. 1944. Aster yellows a hazard in onion seed production. *Wisc. Agric. Exp. Stn Bul.* 463, 50 – 51.
- LEE, Y., W., YAMAZAKI, S., OSAKI, T. A INOUYE, T. 1979. Two elongated viruses in garlic, garlic latent virus and garlic mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 45, 727 – 734. ISSN 1882-0484.
- LEISOVA – SVOBODOVA, L., A KARLOVA – SMEKALOVA, K. 2011. Detection of Garlic Viruses Using SYBR Green Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology.* 159(6), 429 – 434. ISSN 1439-0434.
- LI, T., S., C. 2000. *Medicinal plants: culture, utilization, and phytopharmacology.* CRC Press. 536 s. ISBN 1-56676-903-5.
- LIZARRAGA, R., TOVAR, P., JAYASINGHE, U. A DODDS J. 1986. Tissue culture for elimination of pathogens. Specialized technology document 3. Av. La Universidad s/n La Molina – Lima.
- LOGAN, J. M., EDWARDS, K. J., A SAUNDERS, N. A. 2009. *Real-time PCR: current technology and applications.* Horizon Scientific Press. ISBN 978-1-904455-39-4.
- LOT, H., CHOVELON, V., SOUCHE, S., A DELECOLLE, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Dis.* 82, 1381 – 1385. ISSN 0191-2917.
- LUNELLO, P., DI RIENZO, J. A CONCI, V., C. 2007. Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant disease.* 91(2), 153 – 158. ISSN 0191-2917.
- LUNELLO, P., DUCASSE, D., A CONCI, V. 2005. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European journal of plant pathology,* 112(4), 371 – 378. ISSN 1573-8469.

- LUNELLO, P., DUCASSE, D., A., HEIGUERA, M., NOME, S., F., A CONCI, V., C. 2002. An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84(1), 11 – 17. ISSN 0028-2944.
- LUNELLO, P., MANSILA, C., CONCI, V., PONZ, F. 2004. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman) RT-PCR assay. *J Virol Methods*. (118) 15 – 21. ISSN 0166-0934.
- LUŽNÝ, J. A VAŠKO, Š. 1982. Cibulové zeleniny, Příroda, Bratislava.
- MA, Y., WANG, H., L., ZHANG, C., J. A KANG, Y., Q. 1994. High rate of virus-free plantlet regeneration via garlic scape-tip culture. *Plant Cell Reports*. 14, 65 – 68. ISSN 1432-203X.
- manual*. 2. vyd. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-309-6.
- MATTHEWS, R., E., F. 1953. Chemotherapy and plant viruses. *J. gen. Microbiol.* 8, 277 – 288. ISSN 1017-7825.
- MATTHWES, R., E., F. 1991. *Plant virology*. 3rd edn. Academic Press, London. ISBN 978-0-12-480553-8. In: HULL, R. 2004. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier: USA. ISBN 0-12-361160-1.
- MAYER, A. 1886. Ueber die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Lanwirtsch. Vers.-Stn.* 32, 451-467. In: HULL, R. 2004. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Elsevier: USA. ISBN 0-12-361160-1.
- MCPHERSON, M., MOLLER, S. 2006. *PCR*. 2. vyd. UK: Taylor and Francis group. s. 1 – 20. ISBN 0-4153-5547-8.
- MELHUS, J., E., REDDY, C., S., HENDERSON, W., J. A VESTAL E. 1929. A new virus disease epidemic on onion. *Phytopathology*. 19, 73 – 77. In: BOS, L. 1982. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta. Hortic.* 127, 11 – 29. ISSN 2406-6168.
- MELO FILHO, P., D., A., NAGATA, T., DUSI, A., N., BUSO, J., A., TORRES, A., C., EIRAS, M. A RESENDE, R., D., O. 2004. Detection of three Alexivirus species

- infecting garlic in Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira*. 39(8), 735 – 740. ISSN 1678-3921.
- MEŠTROVIĆ, T. 2015. News Medical. Life Sciences&Medicine. *News-Medical.Net*. [online]. 21. 9. 2015 [cit. 2015-09-21]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Ribavirin-Mechanism.aspx>.
- MOHAMED, N., A. A YOUNG, B., R. 1981. Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic (and transmitted by *Myzus persicae*). *New Zealand. Ann. Appl. Biol.* 97, 65 – 309.
- MOREL, G. T. A MARTIN, C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences*. 235(21), 1324 – 1325.
- MOREL, G., MARTIN, C., A MULLER, J., F. 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *CR Acad. Agric. Fr.* 41, 472 – 475.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. A ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1), 263 – 73.
- NAGY, P. D. A POGANY, J. 2011. Replication of plant RNA viruses. In: CARANTA C., et al. *Recent Advances in Plant Virology*, s. 19 – 46. ISBN 978-1-904455-75-2.
- NAIDU, R., A. A HUGHES J., D'A. 2001. Methods for the detection of plant virus diseases. In: HUGHES, J., D'A A BO ODU (eds.). *Plant virology in sub-Saharan Africa*. Proceedings of a Conference Organized by IITA. International Institute of Tropical Agriculture. Nigeria. s. 233 – 260.
- NAUŠOVÁ, O., KUČEROVÁ, Z., ONDRUŠIKOVÁ, O., KŘÍŽAN, B., WASSERBAUEROVÁ, L., SOUKUPOVÁ, J. A KARLOVÁ K. 2008. Zhodnocení účinnosti metody izolace meristému při ozdravování 20 odrůd česneku. In ŘEHOUT, V. *Biotechnology 2008*. 1. vyd. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing. s. 193 – 195. ISBN 80-85645-58-0.

- NAVACCHI O., ZUCCHERELLI G., ZUCCHERELLI S. 2005. In Vitro multiplication of Artichoke and virus elimination by thermotherapy and chemotherapy. *Acta Hort.* 681, 397 – 402. ISSN 2406-6168.
- NAVRÁTIL, M., SAFÁROVÁ, D., TKADLECOVÁ, E., A KLUKÁCKOVÁ, J. 2005. Molecular characterization of Czech and Chinese leek yellow stripe virus isolates from garlic. *Acta virologica*, 50(3), 207 – 210. ISSN 1336-2305.
- NAVRÁTIL, M., ŠAFÁŘOVÁ, D., DUCHOSLAVOVÁ, J. 2007. Partian molecular characterization of Onino yellow dwarf virus isolates from infecting garlic. In: 7<sup>th</sup> *International symposium in the Series, Plant biotechnology: Impact on high quality plant production*. Vysoké Tatry, Stará Lesná, 10. - 16. 6. 2007: 138. ISBN 978-80-89088-51-5.
- NOVÁK, B., J. 1959. Ein Beitrag zur Kenntnis der Viruskrankheiten der Zwiebelgemüse in der Tschechoslowakei. *Sbor. Vys. Škol. Zem. v Praze*, 287 – 309.
- NOVÁK, F., J. 1990. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Academia Praha. ISBN 80-200-0344-4.
- NOVÁK, J., B. 1959. Příspěvek k poznání viróz cibulové zeleniny v ČSSR. *Sborník VŠZ Praha*, Prague, Czechoslovakia.
- OHKOSHI, K. 1991. Production of virus-free plants by meristem culture vegetables and ornamental plants. In: *The Biological Control of Plant Diseases*. FFTC Book Series No. 42, ASPAC Food and Fertilizer Technology Centre, pp. 87–95.
- ONDRUŠIKOVÁ, E., SASKOVÁ, H., ČECHOVÁ, J. A KŘÍŽAN B. 2009. The effect of genotype on sanitation of garlic plants (*Allium sativum* L.). In *New developments in green gene technology*. 1. vyd. Szeged, Hungary: Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences.
- OTHMAN, B., A., SHOMAN, S., A. 2004. Antiphytoviral Activity of the Plectranthus tenuiflorus on Some Important Viruses. *Int. J. Agri. Biol.* 6, 844-849. ISSN:1934-6352.

- PALUDAN, N. 1980. Virus attack on leek: survey, diagnosis, tolerance of varieties and winterhardiness. *Tidsskr. Planteavl.* 84, 371–385. ISSN: 0040-7135.
- PARK, S., W., JEON, J., H., KIM, H., S. A JOUNG, H. 1994. Effectes of antiviral chemical on eradication of Potato virus S in potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tip culture. *J. korean Soc. hort. Sci.* 35, 32-35. ISSN 1226-8763.
- PATEŇA L., F. A RASCO-GAUNT, S. M. 1998. Seed production and in vitro conservation systems for garlic and shallot. *Acta Hort.* 461, 503 – 513. ISSN 2406-6168.
- PATEŇA, L., F., DOLORES, L., M., BARIRING, A., L., ALCACHUPAS1, A., L., LAUDE1, N., P., BARG, E., GREEN, S., K. A BARBA, R., C. 2005. Improved Technique for virus elimination in and production of certified planting materials of garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Hort.* 694, 271 – 274. ISSN 2406-6168.
- PETŘÍKOVÁ, K. 2006. *Zelenina: pěstování, ekonomika, prodej*. Profi Press, Praha, 1. Vydání. 240 s. ISBN 80 - 86726 - 20 - 7.
- PHILLIPS S. 1990. The efficacy of four antiviral compounds in the elimination of narcissus viruses during meristem tip culture. *Acta Hort.* 266, 531-538. ISSN 2406-6168.
- PODEŠVA, J. et al. 195. Encyklopedie zelinářství Vol. 2, Československá akademie zemědělských věd, Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- PRAMESH, D., A BARANWAL, V., K. (2013). Molecular characterization of coat protein gene of Garlic common latent virus isolates from India: an evidence for distinct phylogeny and recombination. *Virus genes*, 47(1), 189-193. ISSN 1572-994X.
- PŪPOLA N., LEPSE L., KĀLE A., MOROČKO-BIČEVSKA I. 2009. Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. *Sodininkystėir Daržininkystė.* 2009. 28(3), 165-172.
- RACCAH B., HUET H., BLANC S. 2001. Potyviruses. In: HARRIS, K., et al. (eds.). *Virus-insect-plant interactions.* s. Academic Press. ISBN 0-12-327681-0.

- RAM, R., VERMA, N., SINGH, A., K., SINGH, L., HALLAN, V. A ZAIDI, A., A. 2005. Indexing and production of virus-free Chrysanthemums. *Biol. Pl.* 49, 49-152. ISSN: 1573-8264
- RAMÍREZ-MALAGÓN, R., R., MORENO, L., P., BORODANENKO, A., SALINAS-GONZÁLEZ, G. J. A OCHOA-ALEJO N. 2006. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86,103 – 110. ISSN 1573-5044.
- RAMÍREZ-RAMÍREZ-MALAGÓN, R., BARBOZA-CORONA, E., ZÚÑIGA-ZÚÑIGA, J., RUIZ-CASTRO, S. A SILVA-ROSALES, L. 2007. Identification of phytopathogenic viruses of garlic (*Allium sativum* L.), in the state of Guanajuato, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 25(1), 11-17. ISSN 2007-8080
- RAZVJAZKINA, G., M. 1971. Das Zwiebelmosaikvirus und seine Verbreitung im Freiland. *Tagungs-Berichte der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften*, D. D. R. 115, 69-76. ISSN 0417-1381.
- Rimantadine. Drugs.com. [online]. Copyright © 2000-2015 Drugs.com [cit. 2015-06-25]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/pro/rimantadine.html>.
- ROD, J., HLUCHÝ, M., ZAVADIL, K., PRÁŠIL, J., SOMSSICH, I., ZACHARDA, M. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy. Ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany rostlin.* Biocont Laboratory, spol. s r. o., Brno. 392 s. ISBN 80-901874-3-9.
- ROSYPAL, S. 2000. *Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA.* 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 604-900. ISBN 80-902-5622-8.
- RYU K. H. A LEE B. Y. 2008. Carlavirus. In: MAHY B. V., J., VAN REGENMORTEL M., H., V. 2010. *Desk Encyklopedia of Plant And Fungal Virology*, Academic press. ISBN 978-0-12-375148-5.
- SAKO, I. 1989. Occurrence of garlic latent virus in *Allium* species. *Plant Prot.* 43, 389–392. ISSN 1805-9341.

- SALOMON, R. 2002. Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants. In: RABINOWITCH, H., D., A CURRAH, L. *Allium crop science: recent advances*, s. 311-327. ISBN0-85199-510-1.
- SALOMON, R., KOCH, M., LEVY, S., GAL-ON, A., A MARSHALL, G. 1996. Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic. In HENDERSON I., F. *British Crop Protection Council Symposium Proceedings*. Farnham, England. 65, 193-197. ISBN 0948404965.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F, MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory*
- SANJEEV, S., BALWINDER, S., GITA, R., AIJAZ ASGHAR, Z., VIPIN, H., AVINASH N. A GURDEEP SINGH V. 2007. Production of Indian Citrus Ringspot virus free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *Journal of Central European Agriculture*. 8(1), 1 – 8. ISSN 1332-9049.
- SANJEEV, S., BALWINDER, S., GITA, R., AIJAZ ASGHAR, Z., VIPIN, H., AVINASH, N., GURDEEP SINGH, V. 2007. Production of Indian citrus ringspot virus free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. *J. Cent. Eur. Agric.* 8, 1 – 8. ISSN 1332-9049.
- SAPÁKOVÁ, E. 2013. Výskyt škůdců česneku kuchyňského v závislosti na nadmořské výšce. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta.
- SENULA, A., KELLER, E., R., J., LESEMAN, D., E. 2000. Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for the establishment of an in vitro collection of garlic (*Allium sativum*). *Acta Hort.* 530, 121 – 128. ISSN 2406-6168.
- SHAHRAEEN, N., LESEMANN, D., E. A GHOTBI, T. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *Journal compilation* © 2008 OEPP/EPPO, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 38, 131–135.



- SCHOLTHOF, K., B., G., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T. A HEMENWAY, C. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 12(9), 938 – 954. ISSN 1364-3703.
- SCHWARTZ, H., F. A MOHAN, K. 2006. Compendium of onion and garlic diseases and pests, 2nd Ed. APS Press.
- SIDAROS, S., A., OMAR R., A., EL-KEWEY, S., A. A EL-KHALIK S., A. 2004. Virus Elimination from Infected Garlic Plants Using Different Techniques. *Egyptian J. Virol.* 1, 333 – 341. ISSN 1687-1685.
- SIDWELL, R., W., HUFFMAN, J., H., KHARE, G., P., ALLEN L., B, L., B.; WITKOWSKI, J., T., ROBINS, R., K. 1972. Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1-f8- D-Ribofuranosyl- 1,2,4-triazole- 3-carboxamide. *Science*. 177(4050), 705–6. ISSN 1095-9203.
- SMÉKALOVÁ, K., STAVĚLÍKOVÁ, H., DUŠEK, K. 2010. Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*. 96(1), 273-274.
- STAVĚLÍKOVÁ H. 2012. Genetické zdroje česneku. In DUŠEK, K. A ROD, J. (eds). 2012. Česnek ve 21. Století. Sborník příspěvků. ISBN: 978-80-7427-102-1.
- STEVENSON, J., H. A MONETTE, P., L. 1983. Delay of onset of leafroll symptom expression in *Vitis vinifera* “Liemberger” from ribavirin-treated in vitro cultures. *Canadian Journal of Plant Science*. 63, 557-560.
- SUHERI, H., PRICE, T., V. 2000. Stemphylium leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 29, 192-199. ISSN 1448-6032.
- SUTARYA, R., P. VAN DIJK. 1994. Virus diseases of shallot and garlic in Java, and prospects for their control. *Acta Hort.* (369) 134-143. ISSN 2406-6168.
- SUTIC, D., D., FORD, R., E., A TOSIC, M., T. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press. 584 s. ISBN 978-0849323027.
- SWARD, R., J. A BRENNAN, A., P. 1994. Diagnosis and control of *Allium* virus diseases in Victoria, Australia. *Acta Hort.* 358, 295-298. ISSN 2406-6168.

- ŠEFROVÁ, H. 2006. *Rostlinolékařská entomologie*. KONVOJ: Brno, 1. vydání. ISBN 80 - 7302 - 086 - 6.
- ŠMARDA, J, DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V. a KOPTÍKOVÁ, J. 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- ŠPÁNIK, V., VALENTA, V. A BRTNICKÝ, V. 1961. An attempt at purification and electron microscopy of the onion yellow dwarf virus. *Biológia (Bratislava)*. 16, 615 – 618.
- TÁBORSKÝ, V. A ŠEDIVÝ, J. 1997. *Rostlinolékařství: učebnice pro střední zemědělské školy*. 1.vyd. Praha: Credit. 347 s. ISBN 80-902295-2-2.
- TAKAICHI, M., YAMAMOTO, M., NAGAKUBO, T. A OEDA, K. 1998. Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in northern Japan. *Plant Disease*. 82(6), 694-698. ISSN: 0191-2917.
- TESTEN, A., L., MAMIRO, D., P., MEULIA, T., SUBEDI, N., ISLAM, M., BAYSAL-GUREL, F. A MILLER, S., A. 2014. First Report of Leek yellow stripe virus in Garlic in Ohio. *Plant Disease*, 98(4), 574-574. ISSN: 0191-2917.
- TSUNEYOSHI, T., MATSUMI, T., DENG, T. C., SAKO, I., AND SUMI, S. 1998. Differentiation of *Allium carlavirus* isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch. Virol.* 143, 1093–1107. ISSN 1432-8798.
- TYMČENKO, V., 1987. Atlas škůdců a chorob zeleniny a brambor. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 181 s.
- URCUQUI-INCHIMA, S., HAENNI, A., L. A BERNARDI, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus research*. 74(1), 157-175. ISSN: 0168-1702.
- VAN DIJK, P. 1993. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 99(2), 1-48. ISSN 0028-2944.

- VCELAR, B., M., FERREIRA, D., I. A NIEDERWIESER, J., G. 1992. Elimination of Ornithogalum mosaic virus in the Ornithogalum cv. Rojel through meristems tip culture and chemotherapy. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29, 51-55. ISSN 1573-5044.
- Velký lékařský slovník. Maxdorf. [online]. 2008. Copyright © Maxdorf [cit. 2015-06-25]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/rimantadin>.
- Věstník Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského. Ročník XIV. Národní odrůdový úřad, číslo 3, 2015. Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2015. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský.
- ViralZone. 2015a. *SIB Swiss Institute of Bioinformatics*. [online]. February 2015 [cit. 2015-02-23]. Dostupné z: [http://viralzone.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/268.html](http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/268.html)
- ViralZone. 2016. *SIB Swiss Institute of Bioinformatics*. [online]. February 2015 [cit. 2016-06-30]. Dostupné z: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/268.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/268.html)
- ViralZone. 2016. *SIB Swiss Institute of Bioinformatics*. [online]. February 2015 [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/50.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/50.html)
- WALKEY, D., G., A. A ANTILL, D., N. 1980. Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *J. Hortic. Sci.* 64(1), 53-60. ISSN 2380-4084.
- WANG, Q., LIU, Y., XIE, Y. A YOU, M. 2006. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research.* 49(2), 119 – 129. ISSN 1871-4528.
- WARD, L., I., PEREZ-EGUSQUIZA, Z., FLETCHER, J., A CLOVER. D., G., R., G. 2009. A survey of viral diseases of Allium crops. *Australasian Plant Pathology.* 38(5), 533-539. ISSN 1448-6032.

- WEI, T., PEARSON, M., N. A FLETCHER, J., D. 2006. Molecular confirmation of New Zealand garlic yellow streak virus as Leek yellow stripe virus. *Australasian Plant Pathology*. 35(3), 341 – 346. ISSN: 1448-6032.
- WEILAND, C., M., CANTOS, M., TRONCOSO, A. A PEREZ-CAMACHO, F. 2004. Regeneration of Virus-Free Plants by In Vitro Chemotherapy of Gflv (Grapevine Fanleaf Virus) Infected Explants of *Vitis vinifera* L. Cv'Zalema'. In: I. International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research 652, 463 – 466.
- WHITLEY, R., J. A GNANN, J., W. 1992. Acyclovir: a decade later. *New England Journal of Medicine*. 327(11), 782. ISSN 1533-4406.
- WOLFE, D. A LISTON, A. 1998. Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, P. A DOYLE, J., J. 1998. Molecular systematics of plants II, DNA sequencing. Springer Science & Business Media 574 s. ISBN 978-1-4615-5419-6.
- WOLFE, D., LISTON, A. 1998. *Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. Molecular systematics of plants II, DNA sequencing*, s. 43–86. ISBN 978-1-4615-5419-6.
- WRIGHT, K. 1986. AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature* 323(6086), 283. ISSN: 0028-0836.
- WYLIE, S., J., LUO H., LI H., JONES M., G. 2012. Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Arch. Virol.* 157(2), 271-284. ISSN 1432-8798.
- ZÁBORSKÝ, J. 1992. Metamorfóza listov In: Bobák, M. et al, *Botanika , Anatomia a morfológia rastlín*, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, s. 308 – 312.
- ZAVRIEV, S., K. 1999. Carlaviruses. In: GRANOFF A. A WEBSTER R. G. 1999. *Encyclopedia of Virology*, 2nd edn. s. 238-242. San Diego: Academic press. ISBN 978-0-12-227030-7.

ZHANG, H., M., YANG, J., CHEN, J., P. A ADAMS, M. J. 2008. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Archives of virology*. 153(10), 1893 – 1898. ISSN 1432-8798.