



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra rostlinné výroby

Bakalářská práce

Přenos významných rostlinných virů mšicemi

Autorka práce: Anna Šedová

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

České Budějovice
2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá mšicemi jako přenašeči mnoha významných rostlinných virů. V práci jsou popsány jednotlivé mechanismy přenosu virů hmyzími vektory. Mšice mohou v důsledku přenosu virů způsobit obrovské ztráty na výnosu pěstovaných plodin a ovocných dřevin.

Cílem práce bylo molekulárními postupy identifikovat mšice jako možné přenašeče rostlinných virů. Analýza vzorků mšic spočívala v izolaci DNA, amplifikaci COI genu DNA metodou PCR a vizualizaci PCR produktů na agarózovém gelu. Vzorky amplifikované DNA byly enzymaticky přečištěny a zaslány na sekvenaci do externí laboratoře. Pomocí programu BLAST byly identifikovány druhy mšic podle vložených sekvencí vzorků. Podařilo se identifikovat 7 druhů mšic (*A. nasturtii*, *A. cacaliasteris*, *B. brassicae*, *D. platanoidis*, *M. euphorbiae*, *R. padi*, *U. cirsii*) a 2 druhy parazitoidů (*A. colemani*, *D. rapae*).

Klíčová slova: mšice, vektor, přenos virů mšicemi, perzistentní přenos, neperzistentní přenos, virové choroby rostlin

Abstract

This bachelor thesis deals with aphids as vectors of many important plant viruses. The work describes the various mechanisms of virus transmission by insect vectors. Aphids can cause huge losses in the yield of cultivated crops and fruit trees due to the transmission of viruses.

The aim of the work was to identify aphids as possible vectors of plant viruses by molecular methods. Analysis of aphid samples consisted of DNA isolation, amplification of the DNA COI gene by PCR and visualization of PCR products on an agarose gel. Amplified DNA samples were enzymatically purified and sent for sequencing to an external laboratory. Using the BLAST program, aphid species were identified according to the inserted sample sequences. Seven species of aphids (*A. nasturtii*, *A. cacaliasteris*, *B. brassicae*, *D. platanoidis*, *M. euphorbiae*, *R. padi*, *U. cirsii*) and two species of parasitoids (*A. colemani*, *D. rapae*) were identified.

Keywords: aphid, vector, aphid virus transmission, persistent transmission, non-persistent transmission, plant virus disease

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, cenné připomínky během zpracovávání a trpělivost.

Obsah

Úvod.....	7
1 Mšice.....	8
1.1 Význam a škodlivost	8
1.2 Morfologie.....	8
1.3 Životní cyklus.....	9
2 Rostlinné viry.....	11
2.1 Možnosti šíření rostlinných virů.....	11
2.2 Přenos virů mšicemi	12
2.2.1 Cirkulativní přenos virů	14
2.2.2 Necirkulativní přenos virů.....	14
2.3 Významné viry přenášené mšicemi.....	16
2.3.1 Brambory	16
2.3.2 Obilniny	17
2.3.3 Řepka.....	17
2.3.4 Řepa cukrovka.....	17
2.3.5 Zelenina.....	18
2.3.6 Ovocné stromy	19
3 Cíle práce	20
4 Materiál a metodika.....	21
4.1 Sběr a uchování vzorků	21
4.2 Izolace DNA mšic pomocí Chelexu	21
4.3 Izolace DNA mšic pomocí CTAB – PVP	22
4.4 Amplifikace DNA pomocí PCR.....	23
4.5 Elektroforéza PCR produktů	24
4.6 Sekvenování	25

5	Výsledky	26
5.1	Izolace DNA.....	26
5.2	Amplifikace DNA	26
5.3	Identifikace druhů mšic	27
6	Diskuse.....	28
	Závěr	30
	Seznam použité literatury.....	31
	Seznam použitých zkratk.....	35

Úvod

Viry jsou jedny z nejdůležitějších patogenů rostlin. Životní cyklus virů je zcela závislý na hostitelské buňce. Přenos rostlinných virů do nových hostitelů je proto důležitou podmínkou jejich přežití. Samotné virové částice nejsou schopny projít přes buněčnou stěnu rostlin. Přenos virů je možný jedině přes mechanicky poraněnou buněčnou stěnu, vegetativním a generativním množením anebo pomocí jiných organismů (vektorů). Vektorem mohou být různé druhy hmyzu, roztočů, háďátek, hub a prvoků. Z hmyzu jsou nejdůležitějšími přenašeči rostlinných virů mšice. To je dáno zejména jejich schopností se velmi rychle množit a způsobem, kterým přijímají potravu. Mšice přenáší viry během sání rostlinných šťáv. Za hlavního přenašeče lze považovat mšici broskvoňovou (*Myzus persicae*), která přenáší přes 180 druhů různých virů.

Přenos virů mšicemi je buď cirkulativní nebo necirkulativní podle toho, zda virus koluje v těle přenašeče nebo se zachytí v ústním ústrojí. Z hlediska možné replikace viru ve vektoru se cirkulativní přenos dělí na propagativní a nepropagativní. Podle doby přetrvávání ve vektoru existují perzistentní, semiperzistentní a neperzistentní typy přenosu.

Virové choroby mohou být příčinou obrovských ztrát na výnosech pěstovaných plodin a ovocných dřevin. V případě viru svinutky bramboru (PLRV) mohou ztráty na výnosu hlíz činit až 90 %. Virus šarky švestky (PPV) může dokonce způsobit 100 % ztrátu v podobě předčasně opadavých plodů. Příznaky napadení se projevují často s různým stupněm intenzity, která závisí především na druhu a kmeni viru a citlivosti odrůdy a plodin. Příznaky infekce se mohou projevovat od prosvětlení žilek listů, žloutnutí, červenání, chlorotickými skvrnami, mozaikami, zakrslostí, deformacemi, až po těžké nekrózy a odumírání rostlin. Proto mohou být virová onemocnění rostlin někdy zaměněna za symptomy abiotického poškození.

Bakalářská práce shrnuje současné poznatky o přenosu významných rostlinných virů mšicemi. Práce poskytuje zároveň přehled o důležitých, mšicemi přenášených vi-rech. Praktická část práce se zabývá identifikací druhů mšic pomocí molekulárních metod.

1 Mšice

1.1 Význam a škodlivost

Mšice (*Aphidinea*) jsou širokou skupinou hmyzu, která u nás zahrnuje asi 850 druhů (Kazda et al., 2007), z toho 50 druhů způsobuje škody na plodinách (Fryč a Rychlý, 2015). Celkový počet popsanych druhů je kolem 5 000, z nichž asi 100 druhů přenáší rostlinné viry.

Mšice škodí sáním rostlinných šťáv a přenosem virů. Virové infekce způsobují fyziologické změny v hostiteli, které vedou k významným ztrátám na výnosu pěstovaných plodin (Jayasinghe et al., 2021). Mšice během sání vylučují sliny, které způsobují poruchy růstu, kadeření a barevné změny listů, případně tvorbu hálek. Poškozené pleťivo může zasychat a být napadeno houbovými patogeny (Fryč a Rychlý, 2020). Sliny také pravděpodobně brání reakci rostliny opravit poškozené buňky, mšice tak může pokračovat v sání na zvoleném místě (Hunter a Capinera, 2004). Mšice znečišťují rostliny medovicí, čímž vytváří vhodné podmínky pro růst černí (Honěk et al., 2017).

Bez ohledu na škodlivost, mají mšice v přírodě svůj význam. Mnoho jiných druhů hmyzu je na mšice určitým způsobem vázáno. Mravenci žijí se mšicemi v symbióze a přijímají jimi vylučovanou medovici jako potravu. Mravenci chrání mšice před nepřátelemi a přenáší je na vhodné rostliny. Přítomnost mravenců na rostlině tak může na mšice upozornit. Medovice mšic je sbírána včelami a tvoří značnou část produkce medu (Fryč a Rychlý, 2015; 2018). Mšice jsou zároveň jediným zdrojem potravy brouků z čeledi slunéčkovitých (*Coccinellidae*). Výhradně mšicemi se také živí larvy některých druhů pestřenek (*Syrphidae*) (Honěk et al., 2017).

Mšice svým potravním chováním spouštějí v rostlinách obranné reakce. Rostliny reagují na fyzické poškození (sání mšic) emisí těkavých látek, které lákají přirozené nepřátele škůdce (berušky, parazitické vosy, zlatoočky, pestřenky). Rostlina fazolu napadená kyjatkou hrachovou (*Acyrtosiphon pisum*) pomocí této obranné reakce láká parazitoida *Aphidius ervi*. Podobné reakce vyvolávají v rostlinách viry, kde uvolňování volatilních látek slouží k přilákání vektorů (de Vos a Jander, 2010).

1.2 Morfologie

Mšice jsou drobný, 0,2 až 8 mm velký hmyz. Hlava je nepohyblivá, hypognátní. Nitkovitá tykadla jsou opatřena čichovými ploténkami (senzoria, rhinaria). Křídla jsou blanitá s podélnou žilnatinou a plamkou, zadní pár je menší než přední (Fryč, 2015).

Mšice mají bodavě-sací ústní ústrojí, které jim umožňuje získávat potravu i bez poškození rostlinných buněk. Toto je důležité pro přenos virů, které pro replikaci potřebují živé buňky hostitele. Viry se tak mohou dostat přímo do cévních pletiv a rozšířit se po celé rostlině (Hunter a Capinera, 2004). Proboscis neboli stilet mšice je složený ze dvou maxilárních stiletů, obklopených párem mandibulárních stiletů. Maxilární stiletu tvoří společně dva kanálky, potravní a menší slinný. Tyto kanálky se na konci stiletu spojují v jeden společný. Silnější mandibulární stiletu slouží k probodnutí epidermis a lepšímu přichycení hmyzu na rostlině. Probodnutí rostlinných buněk je umožněno pohybem dvou mandibulárních stiletů nezávisle na sobě. Mšice tedy mohou vést stilet rostlinnou tkání buď intercelulárně nebo přímo přes buňky. V distální části stiletu jsou zabudovány specifické proteinové receptory, sloužící jako vazebná místa neperzistentně přenášených virů (Jayasinghe et al., 2021).

Trávicí soustava mšic umožňuje filtraci přijímané rostlinné šťávy. Nadbytek cukerné složky je vylučován v podobě medovice (Honěk et al., 2017). Tělo mšic je měkké a může být různě zbarvené. Na zadečku mají trubičkovité útvary, zvané sifunkuly, jimiž vylučují výstražné látky v případě nebezpečí. Na konci zadečku je chvostek (Kazda et al., 2007).

U mšic se vyskytuje polymorfismus, kdy jeden druh může vytvářet několik morfologicky odlišných forem. Mohou tak například vznikat bezkřídlé i okřídlené samičky. Okřídlené mšice mají pevnější tělo a mohou přelétat na blízké rostliny nebo se nechat unášet větrem na velmi vzdálená místa. Kyjatka osenní (*Sitobion avenae*) může tímto způsobem migrovat i přes 500 km. Okřídlené formy jsou škodlivější díky možnosti přenášet viry na větší vzdálenosti. Bezkrídlé samičky se ale vyznačují vyšší reprodukci (Fryč a Rychlý, 2018).

1.3 Životní cyklus

Vývoj mšic je poměrně složitý. Probíhá u nich proměna nedokonalá přes 4 larvální instary. U nás mají mšice 6 až 16 generací ročně. V jiných zemích může mít mšice bavlníková (*Aphis gossypii*) až 50 generací. Vývojový cyklus mšic může být holocyklický, kdy vznikají oboupohlavní i jednopohlavní generace (rodozměna) nebo anholocyklický, kde probíhá pouze partenogeneze (Fryč a Rychlý, 2018). Partenogenezi se mohou mšice množit rychleji než pohlavní cestou. Březí matky nesou potomstvo, ve

kterém už se vyvíjí další embrya. Jedna mšice tak v sobě nese více generací, čímž se zkracuje generační interval (Jayasinghe et al., 2021).

Monocyklické druhy (žijící na jednom hostiteli) přezimují ve stádiu vajíček, ze kterých se na jaře líhnou samičky. Tyto zakladatelky rodí bez oplození nymfy, z nichž se vyvíjejí bezkřídlé i okřídlené živorodé partenogenetické samičky. Poslední generace je často bezkřídlá a poskytuje oboupohlavní (amfigonické) potomstvo.

U dicyklických druhů (střídající hostitele) mšic žije potomstvo spolu se zakladatelkou na primární hostitelské rostlině (zimní hostitel) (Fryč, 2020). Zde se vyvíjí několik generací bezkřídlých partenogenetických samiček. Později, když přestane rostlina vyhovovat, začnou se vyvíjet okřídlené samičky, které migrují na sekundární hostitelské rostliny (letní hostitel). Jejich potomstvo je bezkřídlé. Poslední generace je opět okřídlená a vrací se na primární hostitele. Potomstvo tvoří okřídlení samečci a bezkřídlé vejcorodé samičky, které po spáření kladou přezimující vajíčka. Výskyt a početnost mšic značně ovlivňují povětrnostní podmínky. Přítomnost zimních hostitelů a úspěšné přezimování vajíček rozhoduje o jarním výskytu mšic (Fryč a Rychlý, 2018).

2 Rostlinné viry

Viry patří mezi nejškodlivější patogeny rostlin. U řady plodin způsobují významné ztráty na výnosu, snížení kvality a tržní hodnoty produkce, snížení životaschopnosti nebo zhoršení kvality množitelského materiálu (Kazda et al., 2007).

Viry jsou nebuněčné organismy životně závislé na hostitelské buňce (Fryč, 2015). Přenos z rostliny na rostlinu je jedinou možností přežití rostlinných virů (Jayasinghe et al., 2021). Strukturu viru tvoří nukleová kyselina (RNA nebo DNA) obklopená proteinovým obalem. Nukleová kyselina zajišťuje infekčnost viru a bílkovinný obal transport viru mezi buňkami infikované rostliny (Kazda et al., 2007). V hostitelské buňce se virus zbavuje obalu a uvolní nukleovou kyselinu, aby mohl vytvořit své kopie. Virové částice se následně šíří pomocí plasmodezmat do dalších buněk a vodivými pleťivými do celé rostliny (Fryč, 2015).

Viry vyvolávají v rostlinách změny v emisi těkavých organických sloučenin, akumulaci živin a obraných látek. Tyto změny mají vliv na migraci mšic, jejich usazování a potravní chování (Carr et al., 2020).

2.1 Možnosti šíření rostlinných virů

Viry se mohou šířit generativním (pylem, semeny) nebo vegetativním množením (Fryč, 2015; Jayasinghe et al., 2021; Kazda et al., 2007). Semeny je přenášeno 6 % popsaných rostlinných virů (Brault et al., 2010). Rostliny vzešlé z infikovaných semen jsou v porostech plodin hlavním zdrojem virů, které mohou být přeneseny mšicemi do dalších rostlin. U viru mozaiky okurky (CMV) byl přenos semeny zaznamenán u rostlin fazolu, špenátu, čočky, lupiny, cizrny, vikve, rajčete a vojtěšky (Jacquemon, 2012). Další možností je přenos infikovanou šťávou přes mechanicky poškozenou buněčnou stěnu. K tomuto dochází nejčastěji při manipulaci s rostlinami, poškozením zemědělskou technikou nebo třením rostlin o sebe ve větru (Kazda et al., 2007).

Buněčná stěna, složená z celulózy, hemicelulózy a pektinu znemožňuje průchod virům do rostliny (Brault et al., 2010; Jayasinghe et al., 2021). Přenos virů vektory je další možností šíření a způsobem, jak překonat (obejít) buněčnou stěnu rostlin. Viry mohou být přenášeny mnoha druhy hmyzu, roztočů a háďátek, případně i některými druhy hub a prvoků (Kazda et al., 2007). Většina rostlinných virů využívá pro přenos z rostliny na rostlinu hmyzí vektory (Gadhavé et al., 2020). Z hlediska přenosu virů jsou nejškodlivějším hmyzem mšice, molice, křísi a třásněnky (Hunter a Capinera,

2004). Nejvýznamnější z nich jsou mšice, zejména polyfágní druhy, jež navštěvují mnoho hostitelských rostlin (Kazda et al., 2007). Mšice maková (*Aphis fabae*) a mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) se mohou vyskytovat na více než 1 000 druzích rostlin (Fryč a Rychlý, 2014).

Rostlinné viry nelze oproti jiným patogenním organismům chemicky regulovat. Jednou z možností, jak předejít těmto onemocněním je ochrana rostlin proti virovým přenašečům (Jayasinghe et al., 2021). Výskyt viróz závisí na početnosti druhů mšic přenášejících daný virus, infekčnosti mšic a podmínkách při migraci (Honěk et al., 2017).

Přenos virů vykazuje různý stupeň specifčnosti, kdy například virus přenášený mšicemi není přenášen hád'átky nebo jednotlivé izoláty viru žluté zakrslosti ječmene (BYDV) jsou přenášeny různými druhy mšic (Andret-Link a Fuchs, 2005). Viry z čeledi *Rhabdoviridae* jsou často přenášeny pouze jedním druhem mšice (Brault et al., 2010). Podobně je tomu u virů z čeledi *Luteoviridae*, kde je každý druh specificky přenášen jedním nebo několika druhy mšic (Heck a Brault, 2018). Virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) a virus žluté proužkovitosti póru (LYSV) infikují výhradně rostliny patřící do rodu *Allium* (Winiarczyk et al., 2014).

2.2 Přenos virů mšicemi

Mšice mohou přenášet až 1/3 všech známých rostlinných virů (Jayasinghe et al., 2021). Nejvyšší počet virů mohou přenášet mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice bavlníková (*Aphis gossypii*), kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*), mšice vojtěšková (*Aphis craccivora*) a mšice maková (*Aphis fabae*). Mšice broskvoňová přenáší přes 180 druhů různých virů (virus neštovic peckovin, závažné virózy bramboru, žloutenky cukrovky) (Fryč a Rychlý, 2014; 2018).

Mšice přenáší viry z čeledí *Bromoviridae*, *Comoviridae*, *Potyviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Sequiviridae*, *Luteoviridae* a *Rhabdoviridae* (Ng a Perry, 2004). Potyviry jsou největší skupinou RNA virů, způsobujících škody na pěstovaných plodinách po celém světě (Gadhavé et al., 2020).

Viry mohou být přenášeny perzistentním, semiperzistentním anebo neperzistentním způsobem. Neperzistentní a semiperzistentní způsoby přenosu jsou označovány jako necirkulativní, perzistentní pak jako cirkulativní (Brault et al., 2010).

Aby k přenosu rostlinného viru došlo, musí vektor (mšice) splnit určité podmínky. Mšice musí navštívit infikovanou rostlinu, získat a udržet virus ve svém těle a přenést ho do zdravé rostliny. Viry používají různé mechanismy k zajištění podmínek svého šíření (Jayasinghe et al., 2021).

Infikované rostliny svým vzhledem většinou podporují usazování mšic. Podle způsobu svého přenosu viry mění vhodnost rostliny jako potravy pro mšice (de Vos a Jander, 2010). Rostlinné viry ovlivňují atraktivitu svých hostitelů pro přenašeče změnou těkavých pachových sloučenin, vzhledu rostliny nebo obojím. Viry s dlouhou akviziční dobou (perzistentní) zvyšují vhodnost rostlinných šťáv pro přenašeče. Mšice se proto přednostně usadí na infikované rostlině, kde zároveň dostatečně dlouho nabývá virus. Viry přenášené krátkým nabodáváním pletiv (neperzistentní) naopak snižují vhodnost rostlin pro vektory (Mauck et al., 2019).

Bylo zjištěno, že virus mozaiky okurky (CMV) vyvolává v rostlině biochemické změny v podobě snížení sacharidů a aminokyselin v rostlinných pletivech a floému a změny rostlinných hormonů (Gadhavé et al., 2020). Infekce CMV může vyvolat u rostlin tykve emisi těkavých organických látek, které přilákají mšice. Virus ale zároveň způsobuje hromadění metabolitů, které odrazují mšice od dlouhodobého sání na rostlině. Viry tímto způsobem mohou podpořit vlastní přenos do nových rostlin. Mšice jsou ale odrazeny od kolonizace rostliny, což vede ke snížení jejich populace (Donnelly et al., 2019).

Na hostitelské rostlině nejprve mšice pomocí tykadel hledá vhodné podněty (pachové signály, textura rostliny) před sáním. Mšice se takto přesouvá po rostlině na vhodná místa ke kolonizaci, která se u jednotlivých druhů liší. Kyjatka zahradní (*M. euphorbiae*) preferuje starší listy, kdežto mšice meruzalková (*N. ribisnigri*) mladší listy salátu. Mšice broskvoňová (*M. persicae*) dává přednost spodní straně listů před svrchní. Následně mšice provádí testovací sondy stiletem, kdy krátce nabodávají pouze epidermální buňky. Tímto způsobem jsou přenášeny neperzistentní (PVY) a semiperzistentní viry (CaMV). Jelikož se mšice primárně živí floémovou šťávou, po testovacím sondování vede stilet mezibuněčnými prostory. Po napíchnutí floému mšice uvolňuje sliny, kterými může přenést virus (BYDV) (Jayasinghe et al., 2021).

2.2.1 Cirkulativní přenos virů

Cirkulativní způsob přenosu je spojován s **perzistentními** viry (Kazda et al., 2007). Perzistentní viry vyžadují dlouhou dobu akvizice (nabytí viru) i inkubační dobu (od nabytí viru po schopnost infekce) a mohou přetrvávat ve vektoru po zbytek jeho života (Andret-Link a Fuchs, 2005; Fryč, 2015). K účinnému přenosu perzistentních virů je potřebné, aby doba akvizice vektorem trvala několik hodin až dnů (Ng a Perry, 2004). Virus se šíří střevním epitelem mšice, dostává se do hemolymfy a odtud do slinných žláz (Brault et al., 2010).

Cirkulativní přenos může být **propagativní** nebo **nepropagativní** v závislosti na tom, zda se virus replikuje v těle přenašeče nebo ne (Brault et al., 2010; Gadhave et al., 2020; Jayasinghe et al., 2021; Ng a Perry, 2004).

Cirkulativní, nepropagativní viry přetrvávají ve vektoru několik týdnů i po svlékání. Tento způsob přenosu je typický pro virus žluté zakrslosti ječmene (BYDV) a jiné luteoviry. Cirkulativní, propagativní a nepropagativní viry se ve způsobu získání a translokace uvnitř vektoru od sebe v podstatě neliší. Rozdíl mezi těmito viry je v době přetrvání ve vektoru, kde propagativní viry zůstávají po zbytek života a mohou být přeneseny na potomstvo (transovariální přenos) (Ng a Perry, 2004).

Cirkulativní, nepropagativní jsou viry patřící do rodů *Enamovirus*, *Luteovirus*, *Nanovirus*, *Polerovirus* a *Umbravirus*. Cirkulativní, propagativní pak pouze rody *Cytorhabdovirus* a *Nucleorhabdovirus* (Andret-Link a Fuchs, 2005). Do rodu *Polerovirus* (čeleď *Luteoviridae*) patří virus svinutky bramboru (PLRV) (Yi a Gray, 2020), nebo virus mírného žloutnutí řepy (BMYV) (Hossain et al., 2021). Perzistentním způsobem je také přenášen polerovirus žluté zakrslosti obilnin (CYDV) (Honěk et al., 2017).

2.2.2 Necirkulativní přenos virů

Necirkulativní přenos virů se podle doby přetrvávání ve vektoru dělí na **neperzistentní** a **semiperzistentní**. Necirkulativní viry jsou vektorem získány během krátké doby a bez latentního období přeneseny na další rostliny (Andret-Link a Fuchs, 2005). Tyto viry přetrvávají ve stiletu nebo v předním střevě mšice. K přenosu dojde, když mšice přelétne na jiného hostitele a krátkými vpichy regurgituje (vyvrhává) infikovanou šťávu do rostliny. Schopnost přenosu se u necirkulativních virů ztrácí při svlékání vektorů, kdy se virus zachytí na kutikule (Kazda et al., 2007). Semiperzistentní viry se

váží na receptory v předním střevě, zatímco neperzistentní viry na receptory ve společném kanálku stiletu (Carr et al., 2020). Většina neperzistentních virů je přenášena mšicemi, semiperzistentní i jiným hmyzem (molice, křísi) (Ng a Perry, 2004).

Dle způsobu molekulární interakce mezi virem a vektorem, existuje tzv. **capsid**-strategie a **helper**-strategie přenosu. V případě capsid-strategie se rostlinný virus váže svým proteinovým obalem přímo na receptor ve stiletu. U helper-strategie dochází k navázání viru na receptor přes pomocnou složku produkovanou virovou RNA. Capsid-strategie se vyskytuje u virů rodu *Cucumovirus* (virus mozaiky okurky, CMV), helper-strategii využívají viry rodů *Potyvirus* a *Caulimovirus* (virus mozaiky kvěťáku, CaMV) (Jayasinghe et al., 2021).

Neperzistentní viry jsou získány vektorem během několika vteřin až minut (Kazda et al., 2007). Schopnost přenosu viru se ztrácí po několika minutách sání na neinfikované rostlině (Hunter a Capinera, 2004). Neperzistentní viry se váží na receptory ve stiletu pouze volně, což umožňuje rychlé nabytí viru z infikované a uvolnění do nové rostliny (Carr et al., 2020). Virus mozaiky vodnice (TuMV) může být vektorem získán i přenesen za méně než 1 minutu (Nellist et al., 2022). Virus Y bramboru (PVY) má optimální akviziční dobu 30 vteřin až 2 minuty a 2 až 16 minut pro inokulaci. Mšice jsou schopny přenést neperzistentní viry v okolí do 300 m (Fryč, 2015).

Neperzistentním způsobem jsou přenášeny viry z rodů *Alfavirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Fabavirus*, *Macluravirus* a *Potyvirus* (Andret-Link a Fuchs, 2005). Mezi ekonomicky významné zástupce rodu *Potyvirus* patří virus mozaiky vodnice (TuMV), který napadá mnoho druhů polních plodin a zeleniny. Z rodu *Potyvirus* má TuMV nejširší okruh hostitelů, zahrnující jednoděložné i dvouděložné rostliny (Nellist et al., 2022).

Infekce neperzistentními viry může v rostlině vyvolat metabolické změny, způsobující emisi látek přitahujících mšice. Infikovaná rostlina tak upoutá pozornost mšice, po krátkém sání se přesouvá na jinou rostlinu, protože infikovaný obsah epidermálních buněk je pro ni nepoživatelný. Během krátkého sání ale získává virus. Rostlinu brzy poté opouští a hledá vhodnějšího hostitele. Viry takto zvyšují pravděpodobnost vlastního přenosu na zdravé rostliny (Carr et al., 2020).

U **semiperzistentního** způsobu přenosu je doba nabytí a přetrvání viru ve vektoru delší. Úspěšnost přenosu se zvyšuje s délkou akvizičního sání. Virus přetrvává ve vektoru maximálně dva až tři dny (Kazda et al., 2007). Většina semiperzistentních virů přetrvává v předním střevě mšice, některé ale mohou být zadrženy ve špičce stiletu

(Gadhavé et al., 2020). Semiperzistentním způsobem jsou přenášeny viry z rodů *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Sequivirus*, *Trichovirus* a *Waikavirus* (Andret-Link a Fuchs, 2005). Jedním z členů rodu *Caulimovirus* je virus mozaiky kvěťáku (CaMV), který je prvním popsáním rostlinným DNA virem (Slavíková et al., 2020). Do rodu *Closterovirus* patří virus žloutenky řepy (BYV), který je přenášen semiperzistentně více jak 20 druhy mšic (Hossain et al., 2021).

2.3 Významné viry přenášené mšicemi

2.3.1 Brambory

Virové choroby brambor mohou mít značný vliv na výnos hlíz. Intenzita symptomů na rostlinách se v závislosti na druhu viru liší. Závažné virové choroby způsobují virus svinutky bramboru (PLRV), virus Y (PVY) a virus A (PVA). Mírnější infekce vyvolávají virus M (PVM), virus X (PVX) a virus S bramboru (PVS). Tyto viry jsou (vyjma PVX) přenosné infikovanou sadbou a mšicemi. Virus S bramboru je přenosný sadbou a mechanickým způsobem. Na bramborách se také může vyskytovat MOP-TOP viróza bramboru (PMTV), která je přenosná zoosporami houby *Spongospora subterranea* a virus kadeřavosti tabáku na bramboru (TRV), přenosný hádčátky rodu *Paratrachodorus* a *Trichodorus* (Dědič, 2014).

Viry jsou závažným problémem produkce brambor po celém světě. Infekce způsobuje snížení výnosu a kvality hlíz. Hlavními přenašeči bramborových virů jsou mšice broskvoňová a kyjatka zahradní. Většina virů na bramborách je přenášena mšicemi neperzistentním způsobem. Virus svinutky bramboru (PLRV) je přenášen perzistentně (Yi a Gray, 2020).

Infekce PLRV může způsobit až 90 % pokles výnosu. Napadení PLRV se na rostlinách zpočátku projevuje žloutnutím, svinováním a vzpřímeným růstem vrcholových listů. V pozdější fázi se tyto příznaky objevují i na spodních listech a rostliny zakrsávají. Virus PVY může způsobovat těžkou mozaiku, povrchové nekrózy, případně opad listů. Intenzita příznaků závisí na kmeni viru a na odrůdě bramboru. Pokles výnosu hlíz může být až 80 %. PVA může vyvolat mírnou mozaiku a zvlnění listů nebo je onemocnění bezpříznakové. Přesto může infekce tímto virem způsobit až 40 % pokles výnosu hlíz (Fryč, 2015).

2.3.2 Obilniny

Nejvýznamnějšími virem obilnin je v našich podmínkách luteovirus žluté zakrslosti ječmene (BYDV). U nás se vyskytují dva kmeny tohoto viru – PAV a RMV. Častější je PAV kmen, který přenáší perzistentně mšice střemchová, kyjatka osenní a kyjatka travní. BYDV se vyskytuje u všech obilnin. Způsobuje zakrslost, případně poruchy v metání nebo předčasné odumírání rostlin. U ječmene a některých odrůd pšenice listy žloutnou od špiček a okrajů, objevují se chlorotické skvrny nebo rozplývavé pruhy. Napadený oves má svinuté listy a okraje jsou oranžově až červenohnědě zbarveny. U kukuřice způsobuje virus na žloutnoucích listech mezižilkovou chlorotickou proužkovitost. Škodlivost viru závisí na citlivosti druhu a odrůdě obilniny, její růstové fázi během infekce a průběhu počasí (Honěk et al., 2017).

2.3.3 Řepka

Mezi hlavní virové choroby řepky patří virus žloutenky vodnice (TuYV), virus mozaiky vodnice (TuMV) a virus mozaiky kvěťáku (CaMV). Na rostlinách se mohou vyskytovat směsné infekce těchto virů. TuYV přenáší cirkulativním, perzistentním způsobem především mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) a mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*). Infekce se projevuje nejčastěji fialovým zbarvením okrajů listů, žloutnutím nebo menší listovou plochou. Bývá obtížné rozlišit infekci od symptomů nedostatečné výživy nebo jiných stresových faktorů. Proto je i těžké určit, do jaké míry má TuYV vliv na výnosové ztráty. Značné škody nejen u řepky ale i zeleniny způsobuje TuMV. Virus je přenášen neperzistentně více než 89 druhů mšic. Symptomy napadení jsou mozaiky a nekrózy na listech, deformaci a nižší počet květů. CaMV má podobné symptomy jako TuMV (Slavíková et al., 2020).

2.3.4 Řepa cukrovka

Virové choroby řepy, se stejně jako v případě řepky, mohou vyskytovat ve směsných infekcích. Hlavním symptomem infekce je žloutnutí listových čepelí. U řepy cukrovky se virové žloutenky začínají objevovat v červenci až srpnu, dle náletu mšic.

Virus žloutenky řepy (BYV) přenáší semiperzistentně mšice maková (*Aphis fabae*) a mšice broskvoňová (*M. persicae*). Příznaky napadení závisí na kmeni viru. Na mladších listech způsobuje BYV prosvětlení žilek, starší listy postupně celé žloutnou,

kromě řapíků. V pozdější fázi se mohou objevit nekrotické skvrny mezi listovou žilnatinou. Onemocnění způsobuje ztráty na výnosu bulev a snížení obsahu cukru.

Virus mírného žloutnutí řepy (BMYV) se projevuje chlorotickými skvrnami na starších listech. Virus přenáší perzistentně mšice broskvoňová. Infekce virem mozaiky řepy (BtMV) vyvolává zesvětlení žilek u srdéčkových listů. Na listech se objevují chlorotické skvrny, které se zvětšují a vytváří typickou mozaiku. BtMV přenáší neperzistentně mšice broskvoňová, mšice maková a kyjatka zahradní (Víchová, 2021).

2.3.5 Zelenina

Významné ztráty způsobuje virus mozaiky okurky (CMV), který napadá zeleninu a mnoho dalších plodin po celém světě. Virus má velmi široké spektrum hostitelských rostlin. Virus je přenášen neperzistentně mnoha druhy mšic, především mšicí broskvoňovou a mšicí bavlníkovou (*Aphis gossypii*). Infekce se většinou projevuje různou intenzitou mozaiky listů. U mnoha plevelných druhů rostlin virus nevyvolává žádné příznaky onemocnění (Jacquemon, 2012). Závažné škody může zapříčinit CMV u lupiny úzkolisté (*Lupinus angustifolius*), v Austrálii byly zaznamenány ztráty na výnosu až 60 % v letech epidemie (Thackray et al., 2004).

Druhým významným virem na zelenině je virus mozaiky vodnice (TuMV). Virus napadá hlavně brukvovitou zeleninu (zelí, růžičková kapusta, květák, kedlubna), ale i jiné plodiny (salát, cuketa, hrách). Údajně jde o jediný vir z rodu *Potyvirus*, infikující rod *Brassica* (Walsh a Jenner, 2002). Symptomy TuMV se dle kmene viru, druhu hostitele a podmínek prostředí projevují odlišně. Na hlávkovém zelí, kvěťáku a růžičkové kapustě se objevují nekrotické skvrny. Tuřín, ředkvičky, řepka, hořčice, čínské zelí nebo křen mohou mít deformované listy pokryté mozaikou (Nellist et al., 2022).

Celosvětově rozšířený je virus mozaiky salátu (LMV). Typickými příznaky napadení jsou u salátu zakrslost, mozaika, deformace a žloutnutí listů. Symptomy se mohou projevovat s různou intenzitou, (dle kmene viru, citlivosti odrůdy) od mírného prosvětlení žilek až po těžké nekrózy a odumírání rostlin. Virus LMV je přenášen neperzistentně mnoha druhy mšic. V polních podmínkách jsou hlavními vektory tohoto viru mšice broskvoňová a kyjatka zahradní. Přenos je možný i semeny, sazenice mají deformované listy (German-Retana et al., 2007).

Plodiny z čeledi miříkovité (*Apiaceae*), (mrkev, petržel, koriandr, pastinák) mohou být napadeny virem CTLV. Infekce způsobuje projasnění žilek a zúžení listů, deformace, zakrnění nebo chlorózy. Virus přenáší neperzistentně mšice broskvoňová a mšice bršlicová (*Cavariella aegopodii*) (EFSA PLH Panel, 2021).

Na rostliny z rodu *Allium* mohou mšice přenášet virus žluté zakrslosti cibule (OYDV) a virus žluté proužkovitosti póru (LYSV). Oba viry jsou přenášeny neperzistentně mšicemi nebo vegetativním množením, ale nemohou se šířit semeny. Virus OYDV nejčastěji napadá cibuli a šalotku. LYSV se vyskytuje hlavně na česneku. (Winiarczyk et al., 2014).

Plodiny z čeledi bobovité (*Fabaceae*) mohou být hostiteli viru mozaiky vojtěšky (AMV). Virus je schopný infikovat přes 600 druhů rostlin. Projevuje se žluto-zelenými mozaikami na listech, u fazolu zakrněním listů a deformací lusků (Mueller et al., 2012).

2.3.6 Ovocné stromy

Nejzávažnější virové onemocnění ovocných stromů způsobuje virus šarky švestky (PPV). Virus napadá většinu druhů peckovin. Projevy symptomů infekce závisí na podmínkách prostředí a citlivosti hostitele. Hlavními příznaky napadení jsou chlorotické skvrny nebo kroužky na listech a deformace plodů (Clemente-Moreno et al., 2015). Plody meruněk se mohou před sklizní rozpálit. Významný pokles výnosu je zapříčiněn předčasným opadem plodů. U citlivých odrůd může onemocnění způsobit až 100 % ztráty. Virus PPV přenáší neperzistentně mšice broskvoňová a mnoho dalších druhů mšic (Jones, 2021).

3 Cíle práce

Cílem práce bylo:

- 1) Vypracovat literární rešerši o přenosu významných rostlinných virů mšicemi.
- 2) Molekulárními postupy identifikovat druhy mšic jako možné přenašeče rostlinných virů.

4 Materiál a metodika

4.1 Sběr a uchování vzorků

Vzorky mšic byly sbírány od července do října roku 2021 z různých hostitelských rostlin na několika lokalitách (viz tab. 1). Vzorky byly sbírány do plastových nádob a uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

Tabulka 1: Sběr vzorků

Číslo vzorku	Hostitelská rostlina	Lokalita sběru
1.	Plevelná řepka	Havlíčkův Brod
2.	Lilek brambor	Havlíčkův Brod
3.	Paprika	Skleník JU FROV
4.	Javor mléč	Havlíčkův Brod
5.	Lilek vejcoplodý	Skleník JU FROV
6.	Střemcha obecná	Bavorov
7.	Lilek brambor	Havlíčkův Brod
8.	Lilek brambor	Havlíčkův Brod
9.	Pcháč rolní	Havlíčkův Brod
10.	Paprika	Havlíčkův Brod

4.2 Izolace DNA mšic pomocí Chelexu

Postup izolace:

- 1) Do 1,5 ml mikrozkuvek byly pinzetou vloženy 3 mšice a přidán 1 ml sterilní vody. Mšice byly rozmělněny plastovým tloučkem a vzniklá směs byla centrifugována 3 minuty při 12 000 rpm (otáček/min).
- 2) Do nových 1,5 ml mikrozkuvek bylo převedeno 300 µl supernatantu a přidáno 200 µl 5 % Chelexu, který byl promíchán.
- 3) Vzorky byly inkubovány 10 minut při 56 °C. Po inkubaci byly mikrozkuvky 10 vteřin vortexovány, poté se ponechaly inkubovat 8 minut při 100 °C.
- 4) Vzorky byly uchovávány při teplotě 4 °C před dalším použitím.

4.3 Izolace DNA mšic pomocí CTAB – PVP

Touto metodou lze získat velké množství kvalitní, čisté DNA. CTAB uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. PVP zbavuje DNA nečistot.

Postup izolace:

- 1) Vzorky mšic byly po 3-5 jedincích vloženy do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 500 μ l CTAB-PVP předehřátého na 65 $^{\circ}$ C a 5 μ l β -merkaptoethanolu. Vzorky byly pečlivě homogenizovány plastovým tloučkem a následně inkubovány při teplotě 65 $^{\circ}$ C po dobu 45 minut. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 minut při 12 000 rpm.
- 2) Supernatant byl přepipetován do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Dále bylo přidáno 500 μ l chloroformu s IAA, směs se 10 minut promíchávala a poté centrifugovala 5 minut při 12 000 rpm.
- 3) Vodná fáze byla převedena do nových mikrozkmavek, přidáno 80 μ l 5 % CTAB a znovu 500 μ l chloroformu s IAA. Vzorky byly promíchávány 10 minut a pak vloženy do centrifugy na 5 minut při 14 000 rpm.
- 4) Do nových mikrozkmavek byla opět odpipetována vodná fáze a přidáno 250 μ l isopropanolu z mazáku a směs se lehce promíchala. V této fázi izolace byly vzorky vloženy na noc do mrazáku (-20 $^{\circ}$ C).
- 5) Druhý den byly vzorky vloženy do vychlazené (4 $^{\circ}$ C) centrifugy na 5 minut při 14 000 rpm. Během tohoto kroku se DNA zachytila na dně mikrozkmavky. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn. Poté bylo přidáno 300 μ l 1x TE pufru a vzorky byly inkubovány při teplotě 37 $^{\circ}$ C po dobu 45 minut. Po přidání 600 μ l ledového 96 % ethanolu se vzorky lehce promíchaly a ponechaly přes noc v mrazáku (-20 $^{\circ}$ C). Vzorky byly poté 10 minut centrifugovány při 4 $^{\circ}$ C rychlostí 14 000 rpm. Supernatant byl slit. Na dně zkumavek vytvořila DNA viditelný pelet.
- 6) K vyizolované DNA byl přidán 1 ml ledového 70 % ethanolu. Vzorky byly opatrně promíchány a umístěny do vychlazené (4 $^{\circ}$ C) centrifugy na 2 minuty při 14 000 rpm. Supernatant byl ihned odstraněn. Tento krok byl dvakrát opakován pro lepší přečištění DNA. Vzorky se ponechaly asi 45 minut schnout.
- 7) Nakonec bylo přidáno 100 μ l 1x TE pufru. Vzorky vyizolované DNA se uchovávaly při 4 $^{\circ}$ C před dalším použitím.

4.4 Amplifikace DNA pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k amplifikaci určité části DNA. Při PCR dojde nejprve k denaturaci DNA na jednořetězová vlákna. Ta pak slouží jako templát k syntéze kopií tohoto úseku. Syntézu kopií katalyzuje enzym DNA-polymeráza. Na templátovou DNA nasedají dva typy primerů (reverse a forward), které vymezují konce amplifikovaného úseku. Pro amplifikaci DNA hmyzu a jiných bezobratlých živočichů jsou používány univerzální DNA primery LCO 1490 a HCO 2198 (Folmer et al., 1994), které specificky amplifikují 710 bp úsek mitochondriálního genu COI (cytochrom c oxidáza – podjednotka I).

Tabulka 2: Použité primery (Folmer et al., 1994)

Název	Sekvence
LCO 1490 (forward) primer	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO 2198 (reverse) primer	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Příprava PCR reakce:

Do označených PCR mikrozkušavek bylo napipetováno 18 μ l reakční směsi (tabulka 3) a 2 μ l DNA. Do kontrolního vzorku byla místo DNA přidána voda (negativní kontrola).

Tabulka 3: Složení PCR reakce

Chemikálie	Objem [μ l]
Master mix	10
LCO 1490 (forward) primer	1
HCO 2198 (reverse) primer	1
H ₂ O	6
DNA	2
Celkový objem	20

Vzorky byly vloženy do termocykleru a spuštěn program s PCR profilem, který je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: PCR profil

Krok	Teplota [°C]	Čas [m: s]	Opakování
1.	94	03:00	
2.	94	00:30	5x
3.	45	00:30	
4.	72	01:00	
5.	94	00:30	
6.	51	01:00	35x
7.	72	01:00	
8.	72	10:00	
9.	4	∞	

4.5 Elektroforéza PCR produktů

Tato metoda slouží k separaci fragmentů nukleových kyselin na základě jejich velikosti. Elektroforéza probíhala v 1,5 % agarózovém gelu.

Postup:

- 1) V Erlenmeyerově baňce bylo naváženo 0,75 g agarózy, ke které bylo přilito 50 ml 1x TBE pufru. Směs byla promíchána a rozpouštěna v mikrovlnné troubě, dokud nebyly vidět žádné kousky agarózy (1-2 minuty).
- 2) Erlenmeyerova baňka s gelem byla následně krátce zchlazena pod tekoucí vodou. Do gelu bylo připipetováno 1,5 µl ethidium bromidu. Gel byl promíchán a vylit do předem připravené elektroforetické (ELFO) vaničky s vloženým hřebínkem, který v gelu vytvoří jamky.
- 3) Po ztuhnutí gelu (20-25 minut) byl opatrně vyjmut hřebínek a ELFO vanička byla umístěna do ELFO vany, jamkami k zápornému pólu. Do ELFO vany byl přidán 1x TBE pufr, tak aby jeho hladina byla 1-2 mm nad gelem.
- 4) Do první jamky v gelu bylo napipetováno 5 µl velikostního markeru (100 bp DNA ladder). Do dalších jamek bylo nanášeno po 15 µl PCR produktu a do poslední negativní vzorek.
- 5) Elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 45 minut. Vizualizace vzorků byla provedena pomocí UV transiluminátoru.

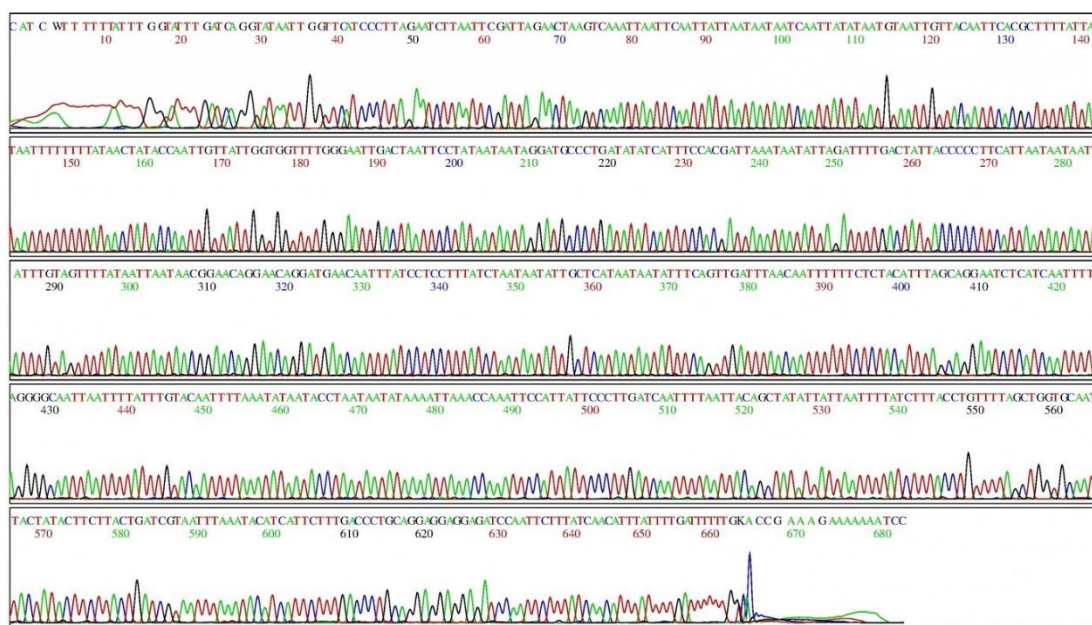
4.6 Sekvenování

Sekvenování je metoda, pomocí níž se zjišťuje pořadí nukleotidů v určitém úseku nukleové kyseliny. Vzorky byly sekvenovány Sangerovou metodou v laboratoři společnosti SEQme s.r.o. Do laboratoře byly zaslány enzymaticky přečištěné PCR produkty smíchané s primerem LCO 1490.

Příprava vzorků:

Do PCR mikrozkrumavek bylo napipetováno po 10 µl amplifikované DNA a 1 µl enzymu ExoSAP. Vzorky byly vloženy do termocykleru a zpuštěn program s profilem: 37 °C 20 min, 80 °C 15 min, 4 °C. Po přečištění bylo ke vzorkům přidáno 5 µl primeru LCO 1490.

Sekvence jednotlivých vzorků byly programem BLAST srovnávány s databází (NCBI) sekvencí. Takto lze identifikovat druhy, ze kterých byla DNA izolována (viz tabulka 5). Výsledkem sekvenování jsou grafy sekvencí, jako příklad je níže uveden graf sekvence úseku COI genu mšice střemchové (*Rhopalosiphum padi*) (obrázek 1). BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) je nástroj na vyhledávání a porovnávání sekvencí, který je k dispozici na webových stránkách Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI).



Obrázek 1: Graf sekvence COI genu – mšice střemchová (*R. padi*).

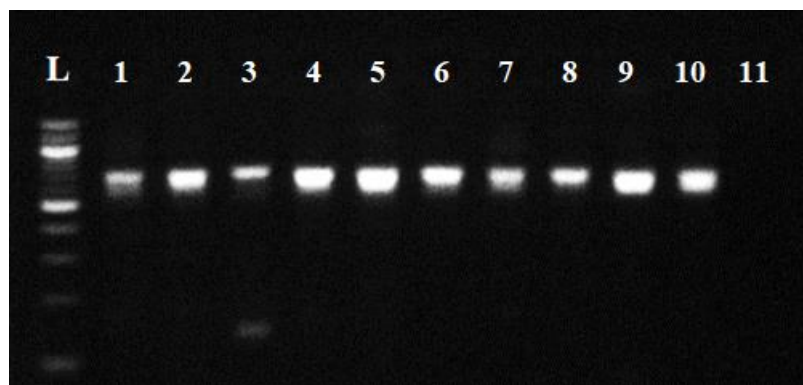
5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

Izolace DNA mšic byla nejprve prováděna metodou Chelex. Vzhledem k opakovaným neúspěchům v amplifikaci DNA, byla jako vhodnější zvolena metoda CTAB-PVP. Izolace DNA se podařila ze všech (10) vzorků mšic.

5.2 Amplifikace DNA

Pro amplifikaci DNA mšic byly použity univerzální primery LCO 1490 a LCO 2198, které amplifikují 710 bp úsek COI genu mitochondriální DNA. Všechny vzorky DNA mšic amplifikovaly, což dokazuje obrázek 2. Vizualizací amplifikovaného úseku COI genu na agarózovém gelu ovšem nelze rozlišit, o jaký druh hmyzu se jedná.



Obrázek 2: Vizualizace PCR amplikonů COI genu na agarózovém gelu

- L 100 bp DNA ladder
1-10 710 bp fragmenty COI genu (PCR amplikonů)
11 kontrola (negativní)

5.3 Identifikace druhů mšic

Identifikované druhy jsou uvedeny v **tabulce 5**. Vzorky mšic č. 1 a 3 se zprvu nepodařilo identifikovat, vyhodnocení sekvencí ukázalo přítomnost parazitických vosiček. Izolována tak byla DNA parazitoida, nikoliv mšice.

Ve vzorku č. 1 byl identifikován druh *Diaeretiella rapae* a ve vzorku č. 3 *Aphidius colemani*. Při další izolaci DNA se podařilo vybrat ze vzorku č. 1 neparazitované jedince a po sekvenaci určit druh mšic. Ve vzorku č. 3 se identifikace mšic opakovaně nepodařila. Důvodem je zřejmě přítomnost parazitoida (*Aphidius colemani*) u všech jedinců. Ve skleníku JU FROV je lumčík *Aphidius colemani* využíván jako prostředek biologické ochrany proti mšicím. Ze stejného místa pochází vzorek č. 5 a druh *Macrosiphum euphorbiae*. Je tedy možné, že se u vzorku č. 3 jedná o stejný druh mšic. U posledního vzorku (10.) se identifikace nepodařila buď z důvodu chyby již při izolaci DNA nebo během sekvenování.

Tabulka 5: Identifikované druhy

Číslo vzorku	Hostitelská rostlina	Druh mšice	Parazitoid
1.	Plevelná řepka	<i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Diaeretiella rapae</i>
2.	Lilek brambor	<i>Aphis nasturtii</i>	
3.	Paprika	*	<i>Aphidius colemani</i>
4.	Javor mléč	<i>Drepanosiphum platanoidis</i>	
5.	Lilek vejcoplodý	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	
6.	Střemcha obecná	<i>Rhopalosiphum padi</i>	
7.	Lilek brambor	<i>Brevicoryne brassicae</i>	
8.	Lilek brambor	<i>Aphis cacaliasteris</i>	
9.	Pcháč rolní	<i>Uroleucon cirsii</i>	
10.	Paprika	*	

* druh mšice nebyl zjištěn

6 Diskuse

Mšice se podle morfologických znaků obtížně přiřazují ke konkrétním druhům. Identifikaci značně ztěžuje polymorfismus mšic. U některých rodů (*Aphis*, *Dysaphis*) je morfologické určení druhu mšice téměř nemožné. PCR amplifikace mitochondriálního genu COI (cytochrom c oxidázy – podjednotky I) je vhodnou molekulární metodou pro identifikaci hmyzích druhů (Coeur d'acier et al., 2014). Pro PCR reakci byly zvoleny univerzální DNA primery LCO 1490 a HCO 2198, které amplifikují 710 bp úsek mitochondriálního COI genu u bezobratlých živočichů (Folmer et al., 1994).

Mšice mohou být parazitovány blanokřídlým hmyzem. Larvy parazitoidů se živí hemolymfou a tkáněmi hostitele, který je usmrcen a jeho tělo mumifikuje. Použitím univerzálních primerů pro amplifikaci sekvence DNA mšice může být amplifikována sekvence mitochondriálního genu DNA parazitoida (Lee a Lee, 2012). Na agarózovém gelu (obrázek 2) však nelze podle amplifikovaného COI genu rozlišit mšice od parazitoidů. Pro identifikaci druhu hmyzu je nutná sekvenace PCR produktů. Lee a Lee (2012) ve své práci uvádějí, že u 5 z 9 vzorků kyjaty osenní (*Sitobion avenae*) byly sekvence podobné s druhy *Aphidius*, *Praon* a *Ephedrus*.

Na řepce byla identifikována mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*) a parazitoid *Diaeretiella rapae*. Mšice zelná škodí na brukvovitých plodinách (řepka, hořčice) a zelenině (brokolice, květák, zelí). Tento druh mšice přenáší více jak 17 rostlinných virů (TuMV, CaMV) (Fryč a Rychlý, 2018).

Diaeretiella rapae je parazitická vosička, která klade vajíčka do těla nymfy (především 2. až 4. instar) nebo dospělé mšice. V důsledku parazitace je tělo mšice mumifikováno a tvoří světle hnědou skořápku (Gill et al., 2013). *Diaeretiella rapae* je typickým parazitoidem mšic, vyskytujících se na brukvovitých rostlinách (mšice broskvoňová, m. zelná, m. trýzelová) (de Vos a Jander, 2010).

Mšice řešetláková (*Aphis nasturtii*) (vzorek č. 2) je významným přenašečem virů bramboru (PVY, PVM, PVS). Primárním hostitelem je řešetlák, v květnu mšice přelétává na brambory, řepu a jiné rostliny (Fryč, 2015). *A. nasturtii* je vektorem nejméně 15 rostlinných virů. Fericean a Corneanu (2017) uvádějí, že může přenášet také virus žloutenky řepy (BYV) a virus mozaiky okurky (CMV). Tento druh se může objevovat ve společných koloniích s mšicí makovou (*Aphis fabae*) (Fryč a Rychlý, 2018).

Aphidius colemani byl identifikován ze vzorku mšic sbíraných na paprice ve skleníku JU. *A. colemani* je parazitoid, který se běžně využívá k biologické ochraně zeleniny a okrasných rostlin ve sklenících, především proti mšici broskvoňové (*Myzus persicae*) a mšici bavlníkové (*Aphis gossypii*). Samička *A. colemani* klade vždy jedno vajíčko do nymfy mšice. Parazitoid prodělává celý vývoj v těle hostitele. Mšice je v důsledku parazitace usmrcena. Tělo mšice je v pozdější fázi vývoje parazitoida mumifikováno (Landa, 2002).

Mšice sbírané z listů javoru byly po sekvenaci přiřazeny k druhu stromovnice javorová (*Drepanosiphum platanoidis*). Výskyt tohoto druhu mšice byl prokázán na jírovcích a javorech. V české republice se na javoru mleči (*Acer platanoidis*) vyskytuje celkem 11 druhů mšic (Fryč, 2016).

Kyjatka zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) (vzorek č. 5) je široce polyfágní druh mšice. Přezimují vajíčka na růžích, sekundárním hostitelem jsou různé druhy rostlin (lilek, řepa, chmel, pryšec, kopretiny). *M. euphorbiae* je vektorem 70 rostlinných virů (LMV, BtMV) (Fryč a Rychlý, 2014). Kyjatka zahradní spolu s mšicí broskvoňovou jsou důležitými škůdci brambor po celém světě (Yi a Gray, 2020).

Mšice střemchová (*Rhopalosiphum padi*) byla nalezena na primárním hostiteli (střemcha). Sekundárními hostiteli jsou obilniny a různé druhy trav, může se ale vyskytovat na některých druzích zeleniny (brambor, cibule rajče) (Fryč a Rychlý, 2018). Tento druh mšice napadá nadzemní i podzemní část hostitelských rostlin. Mšice střemchová je vektorem poleroviru žluté zakrslosti obilnin (CYDV) (Honěk et al., 2017).

Mšice *Aphis cacaliasteris* byla nalezena na bramboru, což není pro tento druh typické. Hostitelem *A. cacaliasteris* je zejména starček (rod *Senecio*) a příbuzné rody z čeledi hvězdicovité (*Asteraceae*) (Blackman a Eastop, 2006).

Na pcháči rolním (*Cirsium arvense*) byl identifikován *Uroleucon cirsii*. Tento druh mšice se běžně vyskytuje na rostlinách rodu *Cirsium*. Primárními hostiteli *U. cirsii* jsou brslen, kalina a pustoryl, sekundárním pcháč (Kluth et al., 2002).

Závěr

Identifikace druhů hmyzích přenašečů podle morfologických znaků je časově náročná a u mnoha druhů v podstatě nemožná. Pro přesnější určení jednotlivých druhů byly zvoleny molekulární postupy, které jsou podrobně popsány v kapitole 4.

Izolace DNA metodou CTAB-PVP se podařila u všech vzorků mšic. Identifikace druhů byla provedena PCR amplifikací úseku mitochondriálního COI genu pomocí univerzálních primerů LCO 1490 a HCO 2198. Elektroforetickou separací na agarózovém gelu byla potvrzena amplifikace úseku COI genu u všech vzorků (obrázek 2). Druhovú identifikace vyžaduje sekvenování, protože vizualizace COI genu elektroforézou neumožňuje na gelu rozlišení mšic od parazitoidů.

Z nasbíraných vzorků mšic se podařilo identifikovat celkem 7 druhů mšic (*A. nasturtii*, *A. cacaliasteris*, *B. brassicae*, *D. platanoidis*, *M. euphorbiae*, *R. padi*, *U. cirsii*) a 2 druhy parazitoidů (*A. colemani*, *D. rapae*).

Výsledky práce potvrzují, že použitím univerzálních primerů LCO 1490 a HCO 2198 pro identifikaci hmyzích druhů lze identifikovat parazitoidy v napadených mšicích. Tato metodika by mohla sloužit jako postup pro zjištění účinnosti parazitoidů dříve, než jsou mšice mumifikovány.

Seznam použité literatury

Andret-Link, P. a Fuchs, M. (2005). Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, 153-165.

Blackman, R. L. a Eastop, V. F. (2006). *Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs. Vol. 2, The Aphids*. Wiley, Chichester. ISBN 0-471-48973-5.

Brault, V. et al. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes rendus biologies*, 333: 524-538.

Carr, J. P. et al. (2020). Modelling and manipulation of aphid-mediated spread of non-persistently transmitted viruses. *Virus research*, 277: 197845.

Clemente-Moreno, M. J. et al. (2015). Sharka: how do plants respond to Plum pox virus infection? *Journal of experimental botany*, 66.1: 25-35.

Coeur d'acier, A. et al. (2014). DNA barcoding and the associated PhylAphidB@ se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *PLoS One*, 9.6: e97620.

Dědič, P. (2014). Hlavní virové choroby bramboru v ČR. Výzkumný ústav bramborářský a Poradenský svaz „Bramborářský kroužek“, Havlíčkův Brod. ISBN 978-80-86940-55-7.

de Vos, M. a Jander, G. (2010). Volatile communication in plant–aphid interactions. *Current opinion in plant biology*, 13.4: 366-371.

Donnelly, R. et al. (2019). Pathogenic modification of plants enhances long-distance dispersal of nonpersistently transmitted viruses to new hosts. *Ecology*, 100.7: e02725.

EFSA Panel on Plant Health (PLH). (2021). Pest categorisation of carrot thin leaf virus. *EFSA Journal*, 19.12: e06931.

Fericean, L. M. a Corneanu, M. (2017). External anatomy and life cycle of *Aphis nasturtii* (Hemiptera: Aphididae). *Pakistan Journal of Zoology*, 49.6.

Folmer, O. et al. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5), 294-299.

Fryč, D. (2015). *Mšice na bramborách: Výskyt, význam, škodlivost a ochrana proti nim*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Opava. ISBN 978-80-7401-115-3.

Fryč, D. (2016). *Mšice a mšičky na lesních dřevinách*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Opava. ISBN 978-80-7401-132-0

Fryč, D. a Rychlý, S. (2014). *Mšice: malý atlas do ruky, 1. díl*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, ISBN 978-80-7401-093-4.

Fryč, D. a Rychlý, S. (2015). *Mšice: malý atlas do ruky, 2. díl*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno. ISBN 978-80-7401-104-7.

Fryč, D. a Rychlý, S. (2018). *Mšice na kulturních plodinách: zelenina*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Opava. ISBN 978-80-7401-127-6.

Fryč, D. (2020). *Hálky a pseudohálky: mšic, mšiček a korovnic*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Opava. ISBN 978-80-7401-188-7.

Gadhavé, K. R. et al. (2020). Aphid transmission of potyvirus: The largest plant-infecting RNA virus genus. *Viruses*, 12.7: 773.

German-Retana, S. et al. (2008). Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Molecular plant pathology*, 9.2: 127-136.

Gill, H. K. (2013). Cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *IFAS Extension*, 1-5.

Heck, M. a Brault, V. (2018). Targeted disruption of aphid transmission: a vision for the management of crop diseases caused by Luteoviridae members. *Current opinion in virology*, 33: 24-32.

Honěk, A. et al. (2017). *Mšice na obilninách: biologie, prognóza a regulace*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha. ISBN 978-80-7427-258-5.

Hossain, R. et al. (2021). New insights into virus yellows distribution in Europe and effects of beet yellows virus, beet mild yellowing virus, and beet chlorosis virus on sugar beet yield following field inoculation. *Plant Pathology*, 70.3: 584-593.

Hunter, W. B. a Capinera, J. L. (2004). Plant viruses and insects. *Encyclopedia of entomology*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1762-1768.

Jacquemond, M. (2012). Cucumber mosaic virus. *Advances in virus research*, 84: 439-504.

Jayasinghe, W. H. et al. (2021). Effect of aphid biology and morphology on plant virus transmission. *Pest Management Science*, 12: 1-9.

Jones, R. A. C. (2021). Global plant virus disease pandemics and epidemics. *Plants*, 10.2: 233.

Kazda, J. et al. (2007). *Škůdci a choroby rostlin: domácí rostlinolékař*. Knižní klub, Praha. ISBN 978-80-242-1886-1.

Kluth, S. et al. (2002). Insects as vectors of plant pathogens: mutualistic and antagonistic interactions. *Oecologia*, 133.2: 193-199.

Landa, Z. (2002). Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo, M. Hričovský, I. et al. (Eds.), *Trvalo udržateľné technológie v záhradníctve*. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra; Výskumný ústav pôdozvedectva a ochrany pôdy, Bratislava, pp. 225-280. ISBN 80-8069-056-1.

Lee, W. a Lee, S. (2012). Unexpected problem in aphid DNA barcoding by universal primers. *Entomological science*, 15.1: 121-126.

Mauck, K. E. et al. (2019). Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current opinion in insect science*, 33: 7-18.

Mueller, E. E. et al. (2012). Crop and non-crop plants as potential reservoir hosts of Alfalfa mosaic virus and Cucumber mosaic virus for spread to commercial snap bean. *Plant Disease*, 96.4: 506-514.

Nellist, C. F. et al. (2022). Turnip mosaic virus, a virus for all seasons. *Annals of Applied Biology*, 16: 1-12.

Ng, J.C.K. a Perry, K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular plant pathology*, 5.5: 505-511.

Slavíková, L. et al. (2020). Virové choroby řepky, jejich výskyt, přenos, přirozené rezervoáry a ochrana. [online] Agromanual.cz [cit. 6. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/virove-choroby-repy-jejich-vyskyt-prenos-prirozene-rezervoary-a-ochrana>

Thackray, D. J. et al. (2004). Forecasting aphid outbreaks and epidemics of Cucumber mosaic virus in lupin crops in a Mediterranean-type environment. *Virus research*, 100.1: 67-82.

Víchová, J. (2021). Choroby řepy (2): Virové choroby řepy (II.). [online] Agromanual.cz [cit. 7. 3. 2022]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/choroby-repy-2-virove-choroby-repy-ii>

Walsh, J. A. a Jenner, C. E. (2002). Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular plant pathology*, 3.5: 289-300.

Winiarczyk, K. et al. (2014). Prevalence of infections with Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus and Garlic common latent virus in plants from the genus *Allium*. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 13.3: 123-133.

Yi, X. a Gray, S. M. (2020). Aphids and their transmitted potato viruses: A continuous challenges in potato crops. *Journal of Integrative Agriculture*, 19.2: 367-375.

Seznam použitých zkratek

BLAST	Basic local alignment search tool
BMYV	<i>Beet mild yellowing virus</i>
BtMV	<i>Beet mosaic virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BYV	<i>Beet yellows virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTLV	<i>Carrot thin leaf virus</i>
CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>
IAA	isoamylalkohol
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OYDV	<i>Onion yellow dwarf virus</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
PMTV	<i>Potato mop-top virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>
PVM	<i>Potato virus M</i>
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVS	<i>Potato virus S</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TuYV	<i>Turnip yellows virus</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
