

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Lucie Sochorcová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Viry bezu černého (*Sambucus nigra* L.)
v kulturním patosystému**

Bakalářská práce

Lucie Sochorcová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a za pomoci uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

Lucie Sochorcová

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá RNA viry napadající bez černý (*Sambucus nigra* L.) v kulturním a planém patosystému. Konkrétně se zaměřuje na *Cherry leaf roll virus*, Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E, Elderberry aureus virus 1 a Rhabdovirus.

Teoretická část obecně charakterizuje rod *Sambucus*, zaměřuje se na bez černý, jeho využití a produkci v České republice a ve světě. Dále se zabývá bakteriálními a houbovými patogeny a škůdci nalezenými v bezu. Charakterizuje čeledi RNA virů napadající bez černý – *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae*, *Tombusviridae* a *Virgaviridae* a charakterizuje konkrétní virové druhy napadající bez.

Experimentální část je zaměřena na detekci *Cherry leaf roll virus*, Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E, Elderberry aureus virus 1 a Rhabdovirus v 85 vzorcích listů bezu černého odebraných v produkční výsadbě a jejím bezprostředním okolí. 54 vzorků pocházelo z produkční výsadby a 31 vzorků z planě rostoucích keřů bezu černého. Na lokalitě byly detekovány 3 viry, a to *Cherry leaf roll virus* v 17 vzorcích, Elderberry aureus virus 1 ve 14 vzorcích a Rhabdovirus v jednom vzorku. Karlaviry v bezu nebyly detekovány. U *Cherry leaf roll virus* a Elderberry aureu virus 1 pocházela většina infikovaných keřů z planých keřů rostoucích v bezprostředním okolí.

SUMMARY

This bachelor thesis is about RNA viruses that infect black elderberry (*Sambucus nigra* L.) in cultural and wild pathosystem. Specifically, it focuses on *Cherry leaf roll virus*, Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E, Elderberry aureus virus 1 and Rhabdovirus.

The theoretical part generally characterizes the genus of *Sambucus*, it focuses on black elderberry, its use and production in the Czech Republic and in the world. It also describes bacterial and fungal pathogens and pests found in elderberry. It characterizes the family of RNA viruses infecting black elderberry – *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae*, *Tombusviridae* and *Virgaviridae*. And it characterizes specific viral species infecting elderberry.

The experimental part is focused on detection of *Cherry leaf roll virus*, Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E, Elderberry aureus virus 1 and Rhabdovirus in 85 samples of elderberry. The samples were collected from elder plants from orchard and from wild elder plants near the orchard. 54 samples came from the orchard and 31 samples from wild elderberry bushes near the orchard. Three species of viruses were detected at the site, namely *Cherry leaf roll virus* in 17 samples, Elderberry aureus virus 1 in 14 samples, Rhabdovirus in one sample. Elderberry carlaviruses was not detected. For *Cherry leaf roll virus* and Elderberry aureus virus 1 most of the infected specimens came from wild bushes growing around the orchard.

Poděkování:

Děkuji prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za trpělivost, ochotu, připomínky a čas, který mi věnoval během zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafářové, PhD. a paní Janě Veselské za pomoc v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Rod <i>Sambucus</i>	3
3.1.1	Bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.).....	3
3.1.2	Využití bezu černého.....	4
3.1.3	Produkce bezu v ČR a ve světě.....	5
3.2	Patogeny a škůdci bezu černého.....	6
3.2.1	Bakteriální patogeny.....	6
3.2.3	Houbové patogeny.....	7
3.2.4	Škůdci bezu.....	7
3.3	Viry infikující bez.....	8
3.3.1	Čeleď <i>Betaflexiviridae</i>	8
3.3.2	Čeleď <i>Bromoviridae</i>	9
3.3.3	Čeleď <i>Secoviridae</i>	10
3.3.4	Čeleď <i>Tombusviridae</i>	13
3.3.5	Čeleď <i>Virgaviridae</i>	14
4	MATERIÁL A METODY	16
4.1	Rostlinný materiál.....	16
4.2	Seznam použitých chemikálií, souprav, roztoků a přístrojů.....	16
4.2.1	Chemikálie.....	16
4.2.2	Soupravy.....	16
4.2.3	Roztoky.....	16
4.2.3	Přístroje.....	16
4.3	Detekce virů.....	17
4.3.1	Izolace celkové RNA.....	17
4.3.2	Reverzní transkripce.....	18
4.3.3	PCR.....	18
4.3.4	Elektroforetická separace.....	20
5	VÝSLEDKY	21
5.1	<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV).....	23
5.2	Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E.....	24
5.3	Elderberry aureus virus 1 (EIAV1).....	24
5.4	Rhabdovirus.....	26

7	ZÁVĚR	31
8	LITERATURA	32

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
BIScV	<i>Blueberry scorch virus</i>
cDNA	komplementární DNA
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CRLV	<i>Cherry rasp leaf roll virus</i>
EBCV145	Elderberry carlavirus 145
EBCV153	Elderberry carlavirus 153
EIAV1	Elderberry aureus virus 1
EIVA–E	Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E
ELV	<i>Elderberry latent virus</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
SLRV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
ssRNA	jednovláknová RNA
SVS	<i>Sambucus virus S</i>
TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TmRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Plody (bezinky) bezu černého (*Sambucus nigra* L.) (Převzato z Botanická zahrada Výstaviště Flora Olomouc, 2018).
- Obrázek 2: Genom rodu *Carlavirus* (Převzato z ViralZone, 2019).
- Obrázek 3: Genom rodu *Bromovirus*. (Převzato z ViralZone, 2019).
- Obrázek 4: Genom čeledi *Secoviridae* (Převzato z ViralZone, 2019).
- Obrázek 5: Genom rodu *Aureusvirus*. (Převzato z ViralZone, 2019).
- Obrázek 6: Genom rodu *Tobamovirus* (Převzato z ViralZone, 2019).
- Obrázek 7: Sad Agrofrukt v Hustopečích a jeho okolí – lokace místa odběru vzorků bezu černého *Sambucus nigra* L. (Zdroj: mapy.cz).
- Obrázek 8: Detekce *Cherry leaf roll virus* pomocí RT-PCR se specifickými primery CLRVi1 a CLRVi2 ve vzorcích bezu černého (*Sambucus nigra* L.).
- Obrázek 9: Rostliny bezu napadené CLRV s příznaky mozaiky, chlorózy a blednutí žilnatiny (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).
- Obrázek 10: Detekce Elderberry aureus virus 1 pomocí RT-PCR se specifickými primery Aur1F a Aur1R ve vzorcích bezu černého (*Sambucus nigra* L.).
- Obrázek 11: Rostlina bezu napadená EIAV1 s příznaky mozaiky a blednutí žilnatiny (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).
- Obrázek 12: Detekce Rhabdovirus pomocí RT-PCR se specifickými primery EB RhabF a EB RhabR ve vzorcích bezu černého (*Sambucus nigra* L.) (Autor: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).
- Obrázek 13: Rostlina bezu napadená rhabdovirem a CLRV s příznaky mozaiky, chlorózy a kroužkovitosti (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek.

Tabulka 2: Teplotní profil PCR reakce pro detekci CLRV.

Tabulka 3: Teplotní profil reakce pro detekci EIAV1.

Tabulka 4: Teplotní profil reakce pro detekci EIVA–E.

Tabulka 5: Teplotní profil reakce pro detekci Rhabdovirus.

Tabulka 6: Přehled infikovaných vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.), lokalita jejich výskytu, příznaky infekce a výsledky detekce *Cherry leaf roll virus*, Elderberry carlavirus A–E, Elderberry aureus virus 1 a Rhabdovirus.

1 ÚVOD

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je významným zástupcem rodu *Sambucus*. Vyskytuje se po celé Evropě a na některých místech Asie. V posledních letech komerční produkce bezu začíná stoupat, jelikož bez nachází velké využití ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu díky značnému obsahu vitamínů a dalších prospěšných látek. Je proto důležité se zaměřit na výzkum patogenů, které by mohly ohrozit výnosy této rostliny v produkční výsadbě a v případě detekce patogenů zabránit jejich dalšímu šíření. V současnosti je výzkum nejvíce zaměřen na detekci virových patogenů. Viry mohou způsobovat chlorózy, nekrózy na listech, žloutnutí listů, nerovnoměrný vývoj plodů, vývojové malformace a prosychání celé rostliny.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma: Víry bezu černého (*Sambucus nigra* L.).
2. Odběr vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.) v produkční výsadbě a z keřů bezu černého rostoucích v jejím okolí.
3. Izolace RNA a detekce komplexu virů pomocí RT-PCR.
4. Porovnání spektra virových druhů vyskytujících v produkční výsadbě a v planě rostoucích rostlinách bezu černého. Stanovení interakcí mezi kulturním a přírodním patosystémem.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Sambucus*

Zástupci rodu *Sambucus* jsou nejčastěji opadavé keře, nízké stromy nebo vzácně také byliny s bohatým mělkým kořenovým systémem rozloženým do šířky nebo podzemními výběžky. Keře obvykle dosahují výšky 5 metrů, stromy mají výšku až 10 metrů. Vyznačují se tlustými větvemi s bílou nebo nažloutlou dřevinou a velkými lenticelami. Listy jsou vstřícné, lichozpeřené, lístky pilovité. Květy mají žlutavě bílou barvu s krátkým trubkovitým kalichem i korunou. Z koruny vyčnívají tyčinky s fialovými nebo žlutými prašníky. Květenstvím je plochý vrcholík nebo vrcholičnatá lata. Plody jsou černě nebo červeně zbarvené dužnaté peckovice zpravidla s pěti peckami. Rostliny rodu *Sambucus* se vyskytují v mírném až subtropickém pásmu obou polokoulí kromě střední a jižní Afriky a v současnosti je známo přes 40 různých druhů. V České republice se přirozeně vyskytují tři zástupci rodu, a to bez černý (*Sambucus nigra* L.), bez červený (*Sambucus racemosa* L.) a bez chebdí (*Sambucus ebulus* L.) (Hejný *et* Slavík, 1997; Koblížek, 2000).

Taxonomické zařazení rodu *Sambucus* značně stěžuje jeho široké geografické rozšíření a morfologická variabilita (Applequist, 2015). Dříve byl tento rod řazen do čeledi *Caprifoliaceae* (zimolezovité). Ale bylo zjištěno, že rod *Sambucus* tvoří společně s rody *Virbunum*, *Sinadoxa*, *Tetradoxa* a *Adoxa* samostatnou monofyletickou skupinu, která se oddělila od zbytku čeledi *Caprifoliaceae*. Rod *Sambucus* nyní patří do řádu *Dipsacales* (štětkařůvce), čeledi *Adoxaceae* (pižmovkovité) (Donoghue *et al.*, 2001).

3.1.1 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je nejčastěji keř, vzácněji strom. Má šedohnědou rozpraskanou kůru, lichozpeřené listy a vejčité lístky, které jsou na okrajích pilovité. Mladé listy na vrcholu vejcovitého pupenu jsou často poškozovány jarními mrazy. Květenstvím jsou velmi široké vrcholíky smetanově bílých květů. Tyčinky jsou přibližně stejně dlouhé jako koruna, prašníky mají žlutou barvu. Čnělka je velmi krátká nebo úplně chybí, blizna je třílaločnatá. Bez kvete od května do června. Zralé plody jsou černé peckovice až 6 mm velké. Bez černý je známý svou proměnlivostí hlavně ve velikosti a tvaru listů, velikosti květenství a v barvě květů, jenž mohou být jak bílé, tak i do žluta zbarvené (Korbelář *et* Endris, 1968; Hajný *et* Slavík, 1997).



Obrázek 1: Plody (bezinky) bezu černého (*Sambucus nigra* L.) (Převzato z Botanická zahrada Výstaviště Flora Olomouc, 2018).

Bez černý je hojně rozšířen v Evropě a Malé Asii, Arménii a na Kavkazu. V ČR roste kromě nejvyšších poloh po celém území. Vyhovuje mu vlhká humózní půda bohatá na dusík, ideální pH půdy se pohybuje mezi hodnotami 5,5–6,5. Ačkoliv je bez černý odolný proti chladnějším teplotám, daří se mu lépe na místech, kde nehrozí náhlé výkyvy teplot. Vyskytuje se na pasekách, v lesích, podél komunikací, zdí a plotů, hojně také na skládkách (Hejný *et* Slavík, 1997; Horáček, 2007; Byers *et al.*, 2014). V Americe je hojný poddruh bezu černého *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* (Applequist, 2015).

3.1.2 Využití bezu černého

Bez černý se hojně využívá jak v lidovém léčitelství, tak i potravinářství a ve farmaceutickém průmyslu. Používají se hlavně květy a plody, ale občas také kůra a kořeny. Květy slouží k přípravě nápojů. Z plodů se vyrábí marmelády, džemy, sirupy, likéry, bezinková vína a také různé extrakty. Plody je rovněž možné využít jako potravinářské barvivo např. k dobarvení vína (Hajný *et* Slavík, 1997, Charlebois, 2007). Bez je zdrojem vitamínů A, B6 a C. Také obsahuje vápník, železo, polyfenoly, antokyanová barviva, steroly a třísloviny. Má velký antioxidační potenciál, díky němuž neutralizuje volné radikály, které mohou být pro naše tělo škodlivé (Charlebois, 2007). Květy bezu pomáhají snížit horečku, mají potopudné a močopudné účinky.

Plody mají mírné projímací účinky. Bez se hojně využívá k léčbě nachlazení, zácpy, ke snížení krevního tlaku nebo třeba k léčbě revmatismu (Charlebois, 2007). Látky obsažené v bezu mají antivirové a antimikrobiální účinky. Mají pozitivní účinek proti viru chřipky, herpes simplex viru a také proti bakteriím jako např. proti původci chronické gastritidy *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* nebo proti vnitrobuněčnému parazitickému prvoku *Plasmodium falciparum*, který způsobuje malárii (Porter *et Bode*, 2017). Dále bylo prokázáno, že extrakt z plodů bezu efektivně inhibuje virus infekční bronchitidy u kuřat (Chen *et al.*, 2014). Kromě květů a plodů našla také využití dřev bezu černého, která slouží jako médium pro přípravu mikroskopických preparátů. Listy se ke konzumaci nevyužívají, protože obsahují alkaloidy (Korbelář *et Endris*, 1968; Květena ČR, 2018).

3.1.3 Produkce bezu v ČR a ve světě

Mezi nejvýznamnější evropské pěstitele bezu černého (*Sambucus nigra* L.) patří Maďarsko, Rakousko, Německo, Polsko, Dánsko a Slovensko (Kaplan, 2011; Fejer *et al.*, 2015; Mlynarczik *et al.*, 2018). V USA není bez černý tak populární jako v Evropě. Je zde pěstován poddruh bezu černého *Sambucus nigra* subsp. *canadensis*. Největší plochy s bezem v USA se nachází v Oregonu (Finn *et al.*, 2008; Cernusca *et al.*, 2011). V Evropě je pro produkci pěstován bez černý (*Sambucus nigra* L.), nejčastěji kultivar 'Haschberg', který slouží především k produkci šťáv z plodů (Veberic *et al.*, 2009). Největší výsadby bezu černého se nacházejí v Maďarsku, kde intenzivní výsadby přesahují 1500 ha. Sklizeň se pohybuje okolo 8 000 až 10 000 tun za rok a z části končí na místním trhu, většina je však exportována do Německa. Velmi významné je pěstování bezu v Rakousku. V roce 2009 sady s bezem černým zaujímaly 1200 ha. Největší výsadba se nacházela ve spolkové zemi Štýrsko (Kaplan, 2011). Sklizeň bezu v Rakousku činila v roce 2017 asi 8 900 tun (Statistik Austria, 2017). V Německu byl bez černý v roce 2017 pěstován na 596 ha. Největší plochou disponuje spolková republika Porýní-Falc, kde výsadby bezu černého přesahují 160 ha. Sklizeň přesahuje 1900 tun plodů a asi 33 tun květů (Statistisches Bundesamt Destatis, 2018). V Polsku se začal bez pěstovat poměrně nedávno. Největší výsadba se nachází na severu Polska, kde je vysázeno asi 150 ha. Bezinky jsou vyváženy v mraženém stavu především do Velké Británie a Německa (Kaplan, 2011). Na Slovensku mezi lety 2005 a 2012 se zvětšila plocha osázená bezem černým z 18 ha na 77 ha. Kultivar 'Hashberg' je zde pěstován na 75 ha, což představuje 97 % celkové plochy. Zbylé 3 % (asi 2 ha) výsadby ploch tvoří kultivary 'Bohatka', 'Dana' a 'Sampo' a ostatní minoritní odrůdy (Fejer *et al.*, 2015). V roce 2010 se v České republice začal bez černý pěstovat na 9 ha nedaleko

města Hustopeče. O rok později byla založena menší výsadba u Znojma. Bez se v ČR využívá především na výrobu šťáv a nealkoholických nápojů v kombinaci s hroznovou šťávou (Kaplan, 2011). Ministerstvo zemědělství České republiky uvádí údaje spojené s bezem černým pouze dohromady s údaji o lísce obecné, jeřábu obecném a černém, ořešáku vlašském, mandloní, kdouloní podlouhlou, kaštanovníkem jedlým a borůvkou. K červnu 2017 činila plocha plodných ovocných produkčních sadů výše uvedených druhů včetně bezu černého 27 ha a plocha mladých ovocných sadů 1 ha (Buchtová, 2017). K červnu roku 2018 se plocha plodných ovocných produkčních sadů výše uvedených druhů zmenšila na 25 ha a plocha mladých ovocných sadů se zvětšila na 5 ha (Buchtová, 2018).

3.2 Patogeny a škůdci bezu černého

Ačkoliv je bez poměrně odolný vůči patogenům a škůdcům, existuje mnoho druhů, které mohou bez napadat. Patogeny i škůdci často snižují vitalitu rostlin a negativně ovlivňují produkci. Ochrana rostlin se zaměřuje především na preventivní opatření, které redukuje podmínky pro výskyt škůdců a patogenů. Mezi ně patří výběr vhodné lokality a zaopatření správné výživy pro rostlinu. Důležité je také odstranění zdrojů infekce likvidací napadených rostlin. Opomenuta by neměla být také biologická ochrana jako například podpora přirozených antagonistů škůdců nebo využití feromonů. Vhodné je také zvážit použití pesticidů, jejichž účinnost na bezu ještě není úplně otestována, jelikož se jí zabývalo jen velmi málo studií (Hluchý *et al.*, 1997; Byers *et al.*, 2014).

3.2.1 Bakteriální patogeny

Rostlinné bakterie mohou být jak škodlivé, tak přínosné pro rostlinu samotnou. Bakterie se do rostliny mohou dostat prostřednictvím stomat, hydratod, lenticel nebo přes poranění (Vidaver *et al.*, 2004). V Missouri byla značně poškozená úroda bezu kvůli bakterii *Pseudomonas viridiflava*, která způsobuje skvrnitost listů. Tato bakterie byla mimo USA nalezena také ve Španělsku, ale ne na rostlinách bezu (González *et al.*, 2003; Byers *et al.*, 2014). Ve vzorcích bezu černého v Idahu byly objeveny bakterie rodu *Xanthomonas* vyvolávající hnědé nekrotické léze na listech, které byly sdružené k sobě a zabíraly 2–3 cm² listové plochy. Větší a starší nekrotické oblasti ohraničoval žlutý okraj (Mohan *et al.*, 2000).

Fytoplazmy

Fytoplazmy jsou velkou skupinou fytopatogenních bakterií způsobující nemoci, které dříve byly považovány za virová onemocnění (Doy *et al.*, 1967). Fytoplazmy lze pozorovat elektronovým mikroskopem v sítkovicích rostlin. Vektory jsou zástupci hmyzu jako např. mery, křísy nebo ploštice (Navrátil *et Fialová*, 2008). Filippin *et al.*, (2008) zjistili, že v rostlinách bezu, které vykazovaly typické příznaky onemocnění způsobeného fytoplazmou jako svinutka, žloutnutí či začervenání, byla přítomna fytoplasma ze skupiny 16SrXII-A v současnosti označována jako *Candidatus Phytoplasma solani* a fytoplasma ze skupiny 16SrXII-E označovaná *Candidatus Phytoplasma fragariae*. Tyto fytoplazmy se běžně vyskytují na skoro celém území Evropy, Chile, Asie (EPPO, 2018a).

3.2.3 Houbové patogeny

Houby patří mezi velmi obsáhlou heterogenní skupinu jednoduše utvářených eukaryot. Patogenní houby mohou napadat různé části rostlin a způsobují lokální poškození, které mohou ve větší míře zapříčinit odumření i celé rostliny (Kůdela *et al.*, 1989). Z houbových onemocnění byla v bezu černém detekována vřekovýtrusná houba *Colletotrichum acutatum* z čeledi *Glomerellaceae*. Tento patogen se vyskytuje běžně v Evropě, Austrálii, ale také v Kanadě a USA. Onemocnění se projevuje skvrnami na listech a šíří se velmi rychle. Ochrana proti jejímu šíření byla zatím zkoumána pouze na jahodách a doporučuje se rostliny ošetřit směsí dichlofluanidu a captan-benomylu (EPPO, 2018b). Další nemocí je rez bezu způsobená druhem *Puccinia bolleyana*. Jedná se o stopkovýtrusnou houbu z čeledi *Pucciniaceae*, jež může způsobit velké ekonomické škody. U méně rozšířených infekcí se doporučuje napadané části rostliny vyříznout a zničit (Byers *et al.*, 2014). Dalším patogenem je vřekovýtrusná houba *Ramularia sambucina*, která napadá listy bezu a podle všeho však neovlivňuje produkci květů a plodů. Tato houba byla detekována v rostlinách bezu rostoucích v Itálii v okolí řeky Nera (Borcean *et David*, 2017). V České republice byla na rostlinách bezu detekována skvrnatička bezová (*Cercospora depazeoides*) (Kolašínová, 2014).

3.2.4 Škůdci bezu

V České republice byla na bezu nalezena mšice bezová (*Aphis sambuci*) (Kolašínová, 2014). Rostliny bezu také poškozují vlnovníci rodu *Phyllocoptes*, což jsou mikroskopičtí roztoči. Způsobují zvrásnění listů a můžou vážně poškodit mladé ovoce. Vlnovníci prezimují

pod šupinami pupenů bezu. V současné době není známo preventivní opatření proti tomuto škůdci. Významný škůdce je brouk druhu *Popillia japonica*. Tito brouci se živí mimo jiné i listy a květy bezu a mohou způsobit rozsáhlé ekonomické škody, avšak na bezu se vyskytují sporadicky. Dalším škůdcem je brouk *Desmocerus palliatus*, který své larvy klade do stonků a kořenů, čímž může způsobit jejich slabost či lámání. Larvy motýla *Tenthredo grandis* mohou způsobit defoliaci nebo přímo poškodit květy. Mezi vážné škůdce bezu patří také *Drosophila suzukii*. Dospělé samice kladou vajíčka přímo do plodů bezu. Vylíhnuté larvy se pak živí bezinkami a plody tak ztrácí na kvalitě. Preventivní opatření proti tomuto škůdci zahrnují odstranění napadených částí rostliny, okamžité zmrazení ovoce po sklizni a chemickou ochranu (Byers *et al.*, 2014). Ve volně rostoucím porostu poddruhu bezu černého *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* v USA byly detekovány tři druhy škůdců z čeledi kněžnicovitých (*Pentatomiadae*) a to *Chinavia hilaris*, *Euschistus servus*, *Euschistus tristigmus*. Tito škůdci poté, co byli nalezeni na bezu, napadali také bavlník a podzemnici olejnou na blízkých polích (Tillman *et Cottrell*, 2016). Významnými škůdci bezu jsou i ptáci požírající plody. Způsobují škody především na menších výsadbách, ve větších sadech ztráty obvykle nejsou tak znatelné. Bez je velmi často vysazován podél sadů s jiným ovocem, aby ptáky odlákal (Way, 1981).

3.3 Viry infikující bez

V současné době bylo zjištěno, že bez infikují zástupci 5 čeledí RNA virů, a to *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae*, *Tombusviridae* a *Virgaviridae*.

3.3.1 Čeleď *Betaflexiviridae*

Čeleď *Betaflexiviridae* se vyznačuje vláknitými viriony s helikální symetrií, které mají v průměru 12–13 nm a 600–1000 nm na délku. Genom má délku 5,9 až 9 kb a je tvořen pozitivně orientovanou ssRNA. Genom je na svém 3' konci polyadenylován a u některých rodů má na 5' konci čepičku. Čeleď *Betaflexiviridae* zahrnuje celkem 11 rodů – *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Chordovirus*, *Citrivirus*, *Divavirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, *Prunavirus*, *Robigovirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*. Bez černý je infikován pouze zástupci rodu *Carlavirus* (ViralZone, 2019; ICTV, 2019).

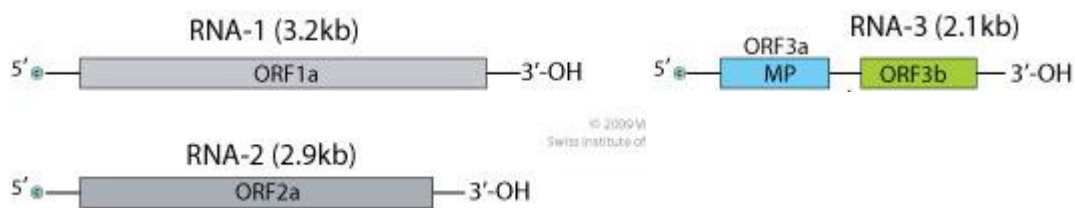


Obrázek 2: Genom rodu *Carlavirus* (Převzato z ViralZone, 2019).

V Nizozemsku byl v bezu nalezen virus identifikovaný jako zástupce rodu *Carlavirus* o délce 678 nm a 12 nm v průměru, jehož přenašečem byla mšice *Myzus persicae*. Virus byl pojmenován Elderberry virus A (Van Lent *et al.*, 1980). Virus podobný Elderberry virus A byl o pár let později detekován také v bývalé Jugoslávii (Miličič *et al.*, 1987). Dále byly v bezu černém detekovány dva druhy rodu *Carlavirus* pojmenované Elderberry carlavirus 145 (EBCV145) a Elderberry carlavirus 153 (EBCV153). Nukleotidové sekvence těchto dvou virů byly z více než 50 % identické. EBCV153 byl dle nukleotidové sekvence více podobný jiným karlaviřům než EBCV145 (Keller *et al.*, 2015). Dalšími zástupci rodu *Carlavirus* nalezenými v bezu byli Elderberry virus A, -B, -C, -D, -E (EIVA–E). Rostliny bezu vykazovaly příznaky jako mozaika, žloutnutí a malformace listů nebo zakrslost (Ho *et al.*, 2016). Bez černý také infikuje *Blueberry scorch virus* (BIScV) (Kalinowska *et al.*, 2013). Tento virus nejčastěji napadá brusnici chocholičnatou (*Vaccinium corymbosum* L.), zaznamenán byl výskyt také u klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon* L.) (Bristow *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2004; Lowery *et al.*, 2005). BIScV se projevuje mozaikami na listech, chlorózami a nekrotizacemi rostlinných částí, kdy u brusnice chocholičnaté vážně snižuje produkci až o jednu třetinu. *Blueberry scorch virus* se přenáší mšicemi rodu *Fimbriaphis*. Virus byl zaznamenán nejvíce v Severní Americe, několik výskytů bylo zaznamenáno také v Itálii a Nizozemsku (Bristow *et al.*, 2000; Ciuffo *et al.*, 2005; EPPO, 2019a). V bezu černém (*Sambucus nigra* L.) byl *Blueberry scorch virus* detekován v Polsku v roce 2013 (Kalinowska *et al.*, 2013).

3.3.2 Čeleď *Bromoviridae*

Čeleď *Bromoviridae* má neobalené viriony ikosahedrické symetrie. Velikost virionů se pohybuje kolem 26 až 35 nm. Jedná se o viry s pozitivně orientovanou ssRNA. Čeleď má segmentovaný, tripartitní genom skládající se z RNA1, RNA2 a RNA3, kdy každý ze segmentů má na svém 3' konci t-RNA podobnou strukturu a na 5' konci čepičku. Velikost genomu je 8 kb (ViralZone, 2019; ICTV, 2019). Čeleď *Bromoviridae* zahrnuje celkem 6 rodů – *Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Iilarvirus* a *Oleavirus*. Bez černý je infikován zástupci dvou rodů. Rodem *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus*) a rodem *Bromovirus* (*Sambucus virus S*) (Uyemoto *et al.*, 1971, Šafářová *et al.*, 2017; ViralZone, 2019).



Obrázek 3: Genom rodu *Bromovirus*. (Převzato z ViralZone, 2019).

Cucumber mosaic virus (CMV)

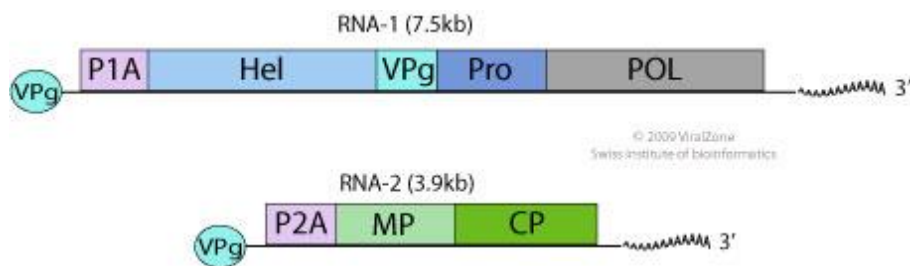
Cucumber mosaic virus má široký okruh hostitelů mezi které patří vřina čínská (*Vigna unguiculata* L.), tykev muškátová (*Cucurbita moschata* L.) či okurka setá (*Cucumis sativus* L.). Viróza se projevuje nekrotickými lézemi, mozaikou či hnědými skvrnami na listech (Description of Plant Viruses, 2019). Virus je rozšířen téměř po celém světě (EPPO, 2019b). CMV byl poprvé detekován v rostlinách bezu pocházejících ze Spojených států a ze Spojeného království (Uyemoto *et al.*, 1971).

Sambucus virus S (SVS)

Sambucus virus S byl nedávno objeven v České republice v rostlinách bezu černého. Rostliny vykazovaly příznaky jako žloutnutí, zakrňlost listů, redukovaný a nerovnoměrný vývoj plodů, avšak tyto příznaky zatím nemohou být asociovány s přítomností SVS (Šafářová *et al.*, 2017).

3.3.3 Čeleď *Secoviridae*

Pro čeleď jsou charakteristické neobalené viriony o velikosti 25–30 nm ikosahedrické symetrie. Genom je obvykle segmentovaný a skládá se z jednoho nebo ze dvou pozitivně orientovaných lineárních vláken ssRNA. Jedná se o molekuly RNA-1 o velikosti 6–8 kb a RNA-2 o velikosti 4–7 kb. Většina zástupců této čeledi jsou významnými rostlinnými patogeny (ICTV, 2019; ViralZone, 2019). Čeleď *Secoviridae* zahrnuje 8 rodů – *Cheravirus*, *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus*, *Torradovirus* a *Waikavirus*. Zástupci infikující bez se nacházejí ve dvou rodech, a to v rodu *Nepovirus* (*Cherry leaf roll virus*, *Tomato black ring virus*, *Tomato ringspot virus*, *Arabidopsis mosaic virus*) a v rodu *Cheravirus* (*Cherry rasp leaf roll virus* a *Strawberry latent ringspot virus*) (Cadman, 1960; Lister, 1964; Uyemoto, 1970; Miličić *et al.*, 1987; Pospieszny *et al.*, 2004; Mishchenko *et al.*, 2016; Villamor *et al.*, 2016; ViralZone, 2019).



Obrázek 4: Genom čeledi *Secoviridae* (Převzato z ViralZone, 2019).

Cherry leaf roll virus (CLR)

Cherry leaf roll virus napadá kromě bezu další rostlinné druhy, jako jsou ořešák královský (*Juglans regia* L.), třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) nebo bříza bělokorá (*Betula pendula* L.) (Rebenstorf *et al.*, 2006). Příznaky onemocnění se druh od druhu odlišují. Způsobuje například chlorotické skvrny na listech, svinutku listů nebo je infekce bezpříznaková (ICTV, 2019). *Cherry leaf roll virus* byl detekován v Severní i Jižní Americe, Evropě, Asii a Austrálii (EPPO, 2019c). Konkrétně na bezu infikovaným CLRV bylo pozorováno výrazné žluté mramorování především mladých listů. *Cherry leaf roll virus* byl v bezu poprvé detekován v roce 1968 v bývalé Jugoslávii. Dále byl CLRV v bezu zaznamenán v České republice, Německu, Maďarsku a Polsku (Rebenstorf *et al.*, 2006; Berniak, 2016; Šafářová *et al.*, 2018). U bezu černého lze CLRV přenést mechanickou inokulací (Plavšić-Banjac *et Miličić*, 1968; Miličić *et al.*, 1987).

Arabis mosaic virus (ArMV)

Arabis mosaic virus má mnoho hostitelů mezi které patří réva vinná (*Vitis vinifera* L.), reveň kadeřavá (*Rheum rhabarbarum* L.) nebo ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.). Způsobuje chlorotické skvrny, mozaiky či nekrózy (Abelleira *et al.*, 2010; Komorowska *et al.*, 2018; ICTV, 2019). Virus je přenášen pomocí hád'átek rodu *Xiphinema* nebo semeny. Dále může být přenášen mechanickou inokulací nebo roubováním (Jha *et Posnette*, 1961). Výskyt ArMV byl zaznamenán především v Evropě, ale také na některých místech v Severní a Jižní Americe, Africe, Asii a Oceánii (EPPO, 2019d). Na bezu byl výskyt ArMV zaznamenán ve Skotsku, kde rostliny vykazovaly příznaky jako žloutnutí žilnatiny a kroužkovitost (Cadman, 1960).

Tomato black ring virus (TBRV)

Tomato black ring virus má rovněž široký okruh hostitelů jako například lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L.), řepu obecnou (*Beta vulgaris* L.), fazol obecný (*Phaesolus vulgaris* L.). Mezi nejčastější příznaky se řadí nekrózy, listové malformace, žluté žilkování, chlorózy. TBRV se přenáší semenem, pylem, vektorem jsou hád'átka rodu *Longidorus* nebo mechanickou inokulací

či roubováním (ICTV, 2019). Virus byl zaznamenán na území Evropy, Indie, Turecka a Japonska (EPPO, 2019e). *Tomato black ring virus* byl v populaci bezu černého poprvé detekován v roce 2004 v Polsku. Infekce způsobená TBRV se projevovala blednutím žilnatiny, chlorotickými skvrnami a také opožděným vývojem listů. TBRV byl z bezu přenesen mechanickou inokulací také na *Chenopodium quinoa* L. (Pospieszny *et al.*, 2004).

Tomato ringspot virus (TmRSV)

Tomato ringspot virus běžně napadá pelargonii páskatou (*Pelargonium hortorum* L.), broskvoň obecnou (*Prunus persica* L.) nebo ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.). Na rostlinách infikovaných TmRSV lze pozorovat řadu příznaků jako například žloutnutí žilnatiny, kroužkovitost, mozaiku či chlorózu na listech. TmRSV se přenáší hád'átky rodu *Xiphinema*, pylem, semeny a mechanickou inokulací. Virus se vyskytuje především v Severní Americe, ale byl také detekován na území Jižní Ameriky, Evropy, Asie, Egypta, Toga a Nového Zélandu. (EPPO, 2019f; ICTV, 2019). TmRSV byl poprvé detekován na bezu ve Spojených Státech ve státě New York. Bez infikovaný TmRSV se projevoval chlorózou na listech, světle zelenými nebo tmavě zelenými skvrnami, kroužkovitostí. U bezu byl potvrzen přenos TmRSV semeny (Uyeomoto, 1970; Uyemoto *et al.*, 1971).

Cherry rasp leaf roll virus (CRLV)

Cherry rasp leaf roll virus se vyskytuje na broskvoni obecné (*Prunus persica* L.), třešni ptačí (*Prunus avium* L.) nebo na jabloni domácí (*Malus domestica* L.). U třešni a broskvoní se virus projevuje výrůstky na spodní straně listů, u jabloní je typickým příznakem svinutka listů a zploštění plodů. CRLV se přenáší hád'átky (*Nematoda*). Výskyt byl zaznamenán v Severní Americe a Číně (EPPO, 2019g). CRLV byl poprvé detekován v rostlinách bezu pocházejících ze Spojených států. Na bezu se CRLV projevoval příznaky mozaiky, kroužkovitosti a deformací listů (Villamor *et Eastwell*, 2016).

Strawberry latent ringspot virus (SLRV)

Strawberry latent ringspot virus byl detekován u jahodníku zahradního (*Fragaria ananassa* L.), ostružiníku maliníku (*Rubus idaeus* L.) nebo u rybízu černého (*Ribes nigrum* L.). Infikovaná rostlina obvykle nevykazuje žádné příznaky, ale mohou se objevit drobné skvrny na listech. Přenašečem onemocnění je *Xiphinema diversicaudatum*. Virus je rozšířen v Evropě, Severní Americe, Egyptě, Indii, Libanonu, Taiwanu a na Novém Zélandu. Na bezu byl SLRV detekován v Anglii. Infikované rostliny bezu se projevovaly žloutnutím žilnatiny (Lister, 1964; EPPO, 2019h).

3.3.4 Čeleď *Tombusviridae*

Pro čeleď *Tombusviridae* jsou typické neobalené viriony s ikosahedrickou symetrií o velikosti 28–34 nm. Genom je tvořen jedinou lineární pozitivně orientovanou molekulou ssRNA a má velikost 3,7–4,8 kb. Výjimku tvoří rod *Dianthovirus*, jehož genom se skládá ze dvou molekul RNA. Čeleď zahrnuje celkem 16 rodů – *Alphacarmovirus*, *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betacarmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Gammacarmovirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Pelarspovirus*, *Tombusvirus*, *Umbravirus* a *Zeavirus*. Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je infikován *Elderberry latent virus* z rodu *Pelarspovirus*, *Tomato bushy stunt virus* z rodu *Tombusvirus*, *Tobacco necrosis virus* z rodu *Betanecrovirus* a *Elderberry aureus virus 1* z rodu *Aureusvirus* (Uyemoto *et al.*, 1971; Jones, 1972; Polák *et al.*, 1990; Šafářová *et al.*, 2018; ICTV, 2019; ViralZone, 2019).



Obrázek 5: Genom rodu *Aureusvirus*. (Převzato z ViralZone, 2019).

***Tomato bushy stunt virus* (TBSV)**

Tomato bushy stunt virus napadá lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L.) nebo lociku setou (*Lactuca sativa* L.). Virus se projevuje chlorózami, nekrózami, žloutnutím listů a typickým zhoustnutím porostu. TBSV se přenáší semeny a pylem. Výskyt viru byl zaznamenán v Kanadě, Jižní Americe, Maroku, střední Evropě, Itálii, Španělsku a Spojeném Království. Na bezu černém byl TBSV poprvé detekován v České republice a projevoval se skvrnami na listech a blednutím žilnatiny (Polák *et al.*, 1990; Cuadrado *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999; Nawaz *et al.*, 2014; EPPO, 2019i).

***Tobacco necrosis virus* (TNV)**

Tobacco necrosis virus se dělí na dva sérotypy – sérotyp A skládající se z kmenů A, B, C, S a sérotyp D skládající se z kmenů D a E. Typickými hostiteli TNV jsou tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.), locika setá (*Lactuca sativa* L.) a okurka setá (*Cucumis sativus* L.). Častým projevem TNV jsou červenohnědé nekrotické léze na listech, které po čase vytvoří celou síť podél žilnatiny (Babos *et* Kassanis, 1963; ICTV, 2019). Přenos *Tobacco mosaic virus* je možný zoosporami houbového obligátního parazita *Olpidium brassicae* (Kassanis *et* MacFarlane, 1965). *Tobacco necrosis virus* byl v bezu pravděpodobně poprvé detekován v roce 1971 v New Yorku (Uyemoto *et al.*, 1971).

Elderberry latent virus (ELV)

ELV byl na bezu detekován v roce 1972 ve Spojených státech. Zatím jediným přirozeným hostitelem *Elderberry latent virus* je bez, avšak mechanickou inokulací byl ELV přenesen například na merlík čilský (*Chenopodium quinoa* L.), okurku setou (*Cucumis sativus* L.) nebo na řepu (*Beta vulgaris* L.). Na merlíku čilském ELV způsobil chlorózy na listech, na ostatních infikovaných rostlinách byla choroba bezpříznaková. Byl testován přenos ELV mšicemi *Macrosiphum euphorbiae* a *Myzus persicae*, ale přenos byl neúspěšný (Jones, 1972; Jones *et al.*, 2000).

Elderberry aureus virus 1 (EIAV1)

V letech 2015–2017 byl v České republice z volně rostoucích rostlin bezu černého (*Sambucus nigra* L.) izolován *Elderberry aureus virus 1*. Rostliny vykazovaly mírné příznaky virového onemocnění jako například chlorotické mozaiky na listech. V přítomnosti ještě jiného viru v rostlině byl pozorován nejednotný vývoj květenství nebo hniloba plodů. Avšak tyto příznaky zatím nemohou být asociovány s EIAV1 (Šafářová *et al.*, 2018).

3.3.5 Čeleď *Virgaviridae*

Čeleď *Virgaviridae* má neobalené viriony helikální symetrie a tyčkovitého tvaru. Velikost virionu je mezi 20 až 25 nm. Zástupci čeledi *Virgaviridae* mají monopartitní genom s pozitivně orientovanou ssRNA. Délka genomu se v závislosti na rodu liší, konkrétně *Tobamovirus* má genom dlouhý 6,3–6,6 kb. Genom má na 5' konci čepičku a na 3' má tRNA podobnou strukturu, která může připojovat aminokyseliny histidin, tyrosin nebo valin. Čeleď *Virgaviridae* zahrnuje celkem 7 rodů – *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Goravirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* a *Tobravirus*. Bez černý napadá *Tobacco mosaic virus* z čeledi *Tobamovirus* (Mueller, 1967; ICTV, 2019; ViralZone, 2019).



Obrázek 6: Genom rodu *Tobamovirus* (Převzato z ViralZone, 2019).

Tobacco mosaic virus (TMV)

Tobacco mosaic virus nejčastěji napadá rostliny z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), mezi které patří tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.) nebo lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L.). Rostliny napadené TMV vykazují velkou variaci příznaků – svinutku listů, zakrnělost listů,

mozaiky na listech, nekrózy. Virus se může přenášet při kontaktu napadené části rostliny se zdravou rostlinou, kontaminovanými nástroji nebo přes semena (American Phytopatology Society, 2019). TMV se na bezu projevoval mozaikami a nekrózami na listech a deformací listů (Mueller, 1967).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

K analýze bylo použito 85 vzorků listů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) odebrané dne 23.5.2018 ze sadu Agrofrukt a jeho okolí v Hustopečích. Bylo odebráno 54 vzorků z rostlin rostoucích přímo v sadu (kultivary 'Bohatka' a 'Dana') a 31 vzorků z rostlin planých rostoucích v okolí sadu. Bylo použito rostlin vykazujících i nevykazujících příznaky onemocnění. U rostlin, které vykazovaly příznaky, se odebíralo minimálně 5 listů s příznaky. U bezpříznakových rostlin se odebralo náhodně minimálně 5 listů po obvodu koruny. Listy byly uchovávány ve -80 °C.

4.2 Seznam použitých chemikálií, souprav, roztoků a přístrojů

4.2.1 Chemikálie

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 63700)

70% ethanol (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99-M1000-1)

Agarose I (Ambresco, kat. č. 97062-250)

BioScript™ reverzní transkriptáza (Bioline, kat. č. BIO-27036)

Deionizovaná voda

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0241)

GoodView II, Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, kat. č. HGV-2)

MyTaq Red DNA polymeráza (Bioline, kat. č. BIO-21110)

Random hexamer primers (Bioline, kat. č. BIO-38028)

4.2.2 Soupravy

NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel kat. č. 740949.250)

4.2.3 Roztoky

1x TAE pufr (20 ml 50x TAE pufru doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou)

4.2.3 Přístroje

Analytické váhy 44-33 N (Kern)

Centrifuga Biofuge Pico (Heraus)

Dokumentační systém G:BOX se softwarem GeneSnap (Syngene)

Elektroforetická komora HU 10 (Scie-Plas)

Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)

Laminární box (PV-100, Telstar)
Mikrovlnná trouba (Daewoo)
Minicentrifuga Spectrafuge 16M (Labnet)
Mrazící box (Ultra Low MDF-U52V, Sanyo)
NanoDrop 1000 Thermo Scientific Spectrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
Termocykler T100TM (BIO-RAD)
UV transiluminátor UV1-14L (Herolab)
Vortex TTS 2 Yellowline (Maneko)
Výrobník ledu (Icematic f100 Compact)
Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)

4.3 Detekce virů

4.3.1 Izolace celkové RNA

Rostlinná RNA byla izolována pomocí NucleoSpin RNA kitu od firmy Macherey-Nagel. K izolaci bylo použito 100 mg listu. Listy byly homogenizovány v 700 μl homogenizačního pufru RA1 a 7 μl merkptoetanolu v homogenizátoru FastPrep při $5,0 \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 30 s. Lyzát byl nanesen na ‘NucleoSpin filtr’ a centrifugován 1 min při 11 000 g. Filtrát byl umístěn bez poškození peletu na dně zkumavky do zkumavky nové, bylo k němu přidáno 700 μl 70% etanolu a směs byla vortexována. Lyzát byl přenesen na ‘NucleoSpin RNA Plant Column’ a centrifugován 30 s při 11 000 g. Kolona byla přemístěna do nové sběrné zkumavky. Na kolonu bylo naneseo 350 μl MDB a byla centrifugována při 11 000 g po dobu 1 min. DNA byla degradována pomocí 95 μl DNase reakční (10 μl DNaseI a 90 μl DNase reakčního pufru) aplikované přímo na střed silikátové membrány kolonky a kolona byla inkubována v pokojové teplotě 15 min. Membrána byla promyta v prvním kroku přidáním 200 μl RA2 na kolonku a centrifugováním 30 s při 11 000 g. Kolonka byla umístěna do nové zkumavky. V druhém kroku byla membrána promyta přidáním 600 μl RA3 na kolonku a centrifugováním 30 s při 11 000 g. Byl odstraněn filtrát a kolonka byla umístěna zpět do sběrné zkumavky. Ve třetím kroku byla membrána promyta přidáním 250 μl RA3 na kolonku a centrifugováním 2 min při 11 000 g. V případě potřeby byl třetí krok opakován. Kolonka byla umístěna do nové ‘nuclease-free’ sběrné zkumavky. RNA byla vymyta v 50 μl ‘RNase-free’ vody a centrifugována 1 min při 11 000 g. Koncentrace a čistota DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000.

4.3.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena spolupracovníky v laboratoři pomocí reverzní transkriptázy BioScript™ (Bioline, kat. č. BIO-27036) a random primerů (Bioline, kat. č. BIO-38028).

4.3.3 PCR

Cherry leaf roll virus, *Elderberry aureus virus 1*, *Elderberry carlavirus A*, -B, -C, -D, -E a *Rhabdovirus* byly detekovány pomocí PCR se specifickými primery.

Pro PCR reakci byla použita MyTaq™ Red Polymerase. Zkumavky byly v průběhu práce uchovávány na ledu a práce probíhala ve sterilním podmínkách. Nejprve byla do jedné zkumavky připravena reakční směs z reakčního pufru, deionizované vody, forward a reverse primerů a Taq polymerázy (viz Tabulka 1). Reakční směs se pipetovala po 18 µl do 0,2ml PCR zkumavek a do každé zkumavky bylo přidáno 2 µl vzorku cDNA. Zkumavky s takto připravenou směsí byly vloženy do termocykleru, kde byly nastaveny podmínky pro PCR amplifikaci.

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek.

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	1 test [µl]
Pufir	5x	1x	4
Voda			13,6
F primer	20 pmol·µl ⁻¹	0,1 µmol·l ⁻¹	0,1
R primer	20 pmol·µl ⁻¹	0,1 µmol·l ⁻¹	0,1
Taq polymeráza	5 U·µl ⁻¹	1 U	0,2

Detekce viru *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Detekce CLRV byla provedena pomocí specifických primerů

CLRVi1: 5'-GTTAACGAATATCTACTGC-3'

a CLRVi2: 5'-CAAATATTGCTAAACAACC-3' dle Bertolini *et al.* (2003).

Teplotní profil reakce je znázorněn v Tabulce 2.

Tabulka 2: Teplotní profil PCR reakce pro detekci CLRV.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	
Denaturace	95 °C	30 s	35x
Hybridizace	50 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	

Detekce viru Elderberry aureus virus 1 (EIAV1)

Detekce EIAV1 byla provedena pomocí specifických primerů

Aur1F: 5'-ATCGACTCGTCATCTTGCCC-3'

a Aur1R: 5'-GTCATAGCGGGACAGAACCC-3' dle Šafářová *et al.* (2018). Teplotní profil reakce je znázorněn v Tabulce 3.

Tabulka 3: Teplotní profil reakce pro detekci EIAV1.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	
Denaturace	95 °C	30 s	35x
Hybridizace	55 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	

Detekce virů Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E (EIVA–E)

Detekce EIVA–E byla provedena pomocí univerzálních primerů

UnivcarlaF: 5'-GYACIGARWSIGAYTRYGARGC-3'

a UnivcarlaR: 5'-GCYTCICCISWRWAICKCATDAT-3' navržených Ho *et al.* (2013).

Teplotní profil reakce je znázorněn v Tabulce 4.

Tabulka 4: Teplotní profil reakce pro detekci EIVA–E.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	
Denaturace	95 °C	30 s	35x
Hybridizace	53 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	

Detekce viru Rhabdovirus

Detekce Rhabdovirus byla provedena pomocí specifických primerů EB RhabF a EB RhabR. Teplotní profil reakce je znázorněn v Tabulce 5.

Tabulka 5: Teplotní profil reakce pro detekci Rhabdovirus.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	
Denaturace	95 °C	30 s	
Hybridizace	55 °C	30 s	35x
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	

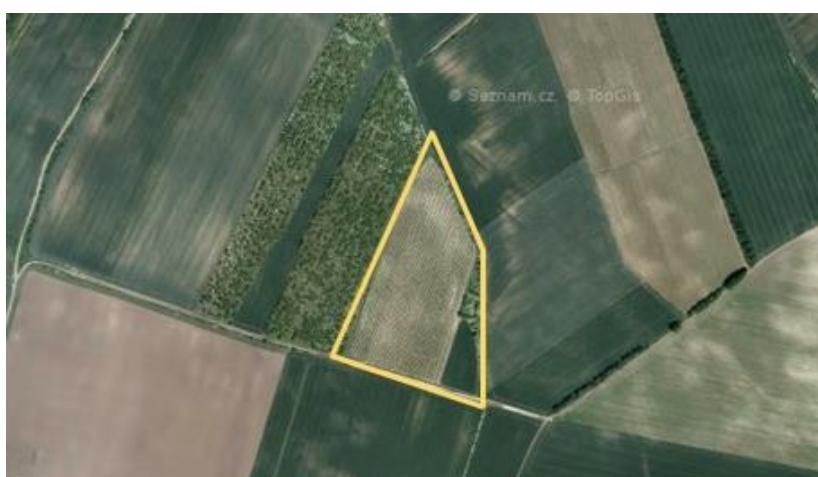
4.3.4 Elektroforetická separace

PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforetické separace v 1,5% agarózovém gelu. Zásobní roztok 1,5% agarózového gelu byl připraven rozvařením 4,5 g agarózy v 300 ml 1x TAE pufru v mikrovlnné troubě. Gel byl uchováván v lednici. Pro elektroforetickou separaci bylo 50 ml gelu nalito do kádinky a krátce po vychladnutí bylo přidáno 3 μ l GoodView barviva, směs byla promíchána a nalita do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel se nechal ztuhnout 15 min při pokojové teplotě a následně asi 20 min v lednici. Ztuhnutý gel byl vložen do vaničky, vyjmul se z něj hřebínek a do vaničky byl po rysku nalit 1x TAE pufr. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 μ l standardu molekulové hmotnosti. Do ostatních jamek bylo pipetováno 5 μ l PCR produktů. Elektroforetická komora byla připojena ke zdroji, který byl nastaven na 80 V. Elektroforetická separace probíhala asi 40 min. Výsledky separace byly vizualizovány pomocí UV-transiluminátoru.

5 VÝSLEDKY

Bylo testováno 85 vzorků listů z rostlin bezu černého *Sambucus nigra* L. pocházejících z Hustopečí ze sadu Agrofrukt a jeho okolí (viz Obrázek 7). 54 vzorků pocházelo přímo ze sadu, 31 vzorků bylo z okolí sadu. Cílem experimentální části byla detekce vybraných RNA virů infikující bez černý (*Cherry leaf roll virus*, *Elderberry carlavirus* A, -B, -C, -D, -E, *Elderberry aureus virus* 1 a *Rhabdovirus*) v sadu a okolí a zjistit, jestli jsou ve frekvencích výskytů jednotlivých virů rozdíly mezi produkční výsadbou a planě rostoucími rostlinami bezu černého. Souhrnný přehled vzorků, ve kterých byl detekován alespoň jeden nebo více výše uvedených RNA virů, včetně jejich místa výskytu a případných příznaků infekce je uveden v Tabulce 6.

Z celkových 85 vzorků byl ve 26 vzorcích detekován alespoň jeden virus, což představuje 30,6 % ze všech testovaných rostlin. 8 nakažených rostlin se nacházelo v produkčním sadu, zbylých 18 rostlin byly planě rostoucí bezy v bezprostředním okolí. Z 8 rostlin pocházejících z produkční výsadby, ve kterých byla nalezena virová infekce, vykazovalo 7 rostlin příznaky virové infekce, zbylý jeden vzorek byl bez příznaků. Z 18 planých rostlin bezu rostoucích v bezprostředním okolí sadu, ve kterých byla detekována virová infekce, vykazovalo 15 příznaky virové infekce a zbylé 3 rostliny byly asymptomatické. Směsná infekce byla přítomna u 6 vzorků, z toho pouze 1 vzorek pocházel ze sadu, ostatní vzorky byly z planých rostlin. V pěti případech se jednalo o kombinaci *Cherry leaf roll virus* a *Elderberry aureus virus* 1 vyskytující se pouze v planě rostoucích rostlinách. V jednom případě se jednalo o kombinace *Cherry leaf roll virus* a *Rhabdovirus*, která byla zjištěna v produkční výsadbě.



Obrázek 7: Sad Agrofrukt v Hustopečích a jeho okolí – lokace místa odběru vzorků bezu černého *Sambucus nigra* L. (Zdroj: mapy.cz).

Legenda: žluté ohraničení – přesné označení místa odběru.

Tabulka 6: Přehled vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.), lokalita jejich výskytu, příznaky infekce a výsledky detekce *Cherry leaf roll virus*, *Elderberry carlavirus A-E*, *Elderberry aureus virus 1* a *Rhabdovirus*.

Vzorek	Lokalita výskytu rostliny	Příznaky infekce na rostlině	CLRV	EIVA-E	EIAV1	Rhabdovirus
76	sad	chloróza, mozaika, blednutí žilnatiny	+	-	-	-
77	sad	chloróza, mozaika, kroužkovitost	+	-	-	-
78	sad	chloróza, mozaika, kroužkovitost	+	-	-	+
93	sad	kroužkovitost	+	-	-	-
111	sad	difúzní mozaika	+	-	-	-
112	sad	difúzní mozaika	+	-	-	-
113	sad	difúzní mozaika	+	-	-	-
124	sad	bez příznaků	-	-	+	-
132	okolí sadu	prosychá, mozaika, bílé okraje listů	+	-	+	-
133	okolí sadu	mozaika, kroužkovitost	+	-	-	-
134	okolí sadu	prosychá	+	-	-	-
135	okolí sadu	chloróza, mozaika, kroužkovitost	+	-	-	-
136	okolí sadu	mozaika, kroužkovitost	-	-	+	-
137	okolí sadu	chloróza, mozaika, kroužkovitost	+	-	+	-
138	okolí sadu	mozaika, kroužkovitost	+	-	+	-
139	okolí sadu	bez příznaků	-	-	+	-
141	okolí sadu	slabá mozaika	+	-	-	-
144	okolí sadu	mozaiky, blednutí žilnatiny	-	-	+	-
151	okolí sadu	bez příznaků	-	-	+	-
152	okolí sadu	chloróza, svinutka	-	-	+	-
153	okolí sadu	světle zelené a našedlé listy	-	-	+	-
154	okolí sadu	prosychá, příznaky mykózy	+	-	+	-
155	okolí sadu	prosychá, malé listy	+	-	+	-
156	okolí sadu	difúzní mozaika	+	-	-	-
157	okolí sadu	difúzní mozaika, svrasklé listy	-	-	+	-
158	okolí sadu	bez příznaků	-	-	+	-

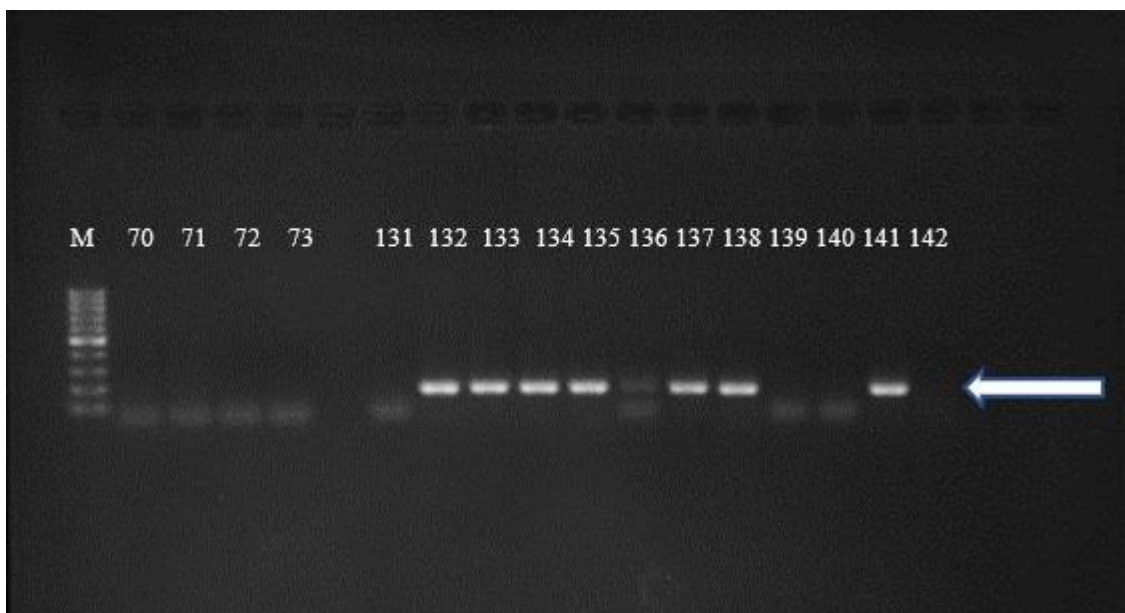
Legenda: CLRV – *Cherry leaf roll virus*, EIVA-E – *Elderberry carlavirus A-E*, EIAV1 – *Elderberry aureus virus 1*, + označení přítomnosti viru, - označení nepřítomnosti viru.

5.1 *Cherry leaf roll virus (CLR)*

Přítomnost CLRV byla zjištěna ve 20 % testovaných vzorků, tj. v 17 keřích z 85 keřů.

Z 54 keřů pocházejících z produkční výsadby bylo 7 keřů pozitivních na CLRV, což představuje 13 %. Všechny pozitivně testované rostliny vykazovaly chlorotickou mozaiku, případně kroužkovitost. V 16 rostlinách vykazujících stejné nebo podobné příznaky však virus nebyl zjištěn. Ani v jednom případě nebyl virus detekován ve vzorcích odebraných z bezpříznakových stromů. Mimo produkční výsadbu bylo testováno 31 keřů. CLRV byl detekován v 10 příznakových keřích tj. 32,3 % případů. Téměř všechny pozitivně testované rostliny vykazovaly příznaky jako mozaika nebo kroužkovitost, občas se objevily také příznaky prosychání a bílých okrajů listů. Opět ani v jednom případě nebyl virus detekován ve vzorcích odebraných z bezpříznakových stromů. Směsné infekce byly detekovány u 6 vzorků, z toho pouze jeden (vzorek 78) pocházel ze sadu. Pozitivní vzorek 78 byl současně nakažen rhabdovirem. Vzorky 132, 137, 138, 154 a 155 byly současně nakaženy Elderberry aureus virus1.

Obrázek 8: Detekce *Cherry leaf roll virus* pomocí RT-PCR se specifickými primery CLRVi1 a CLRVi2 ve vzorcích bezu černého (*Sambucus nigra* L.).



Legenda: M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, 70–142 – označení jednotlivých vzorků bezu, šipka – označení specifického produktu.



Obrázek 9: Rostliny bezu napadené CLRV s příznaky mozaiky, chlorózy a blednutí žilnatiny (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).

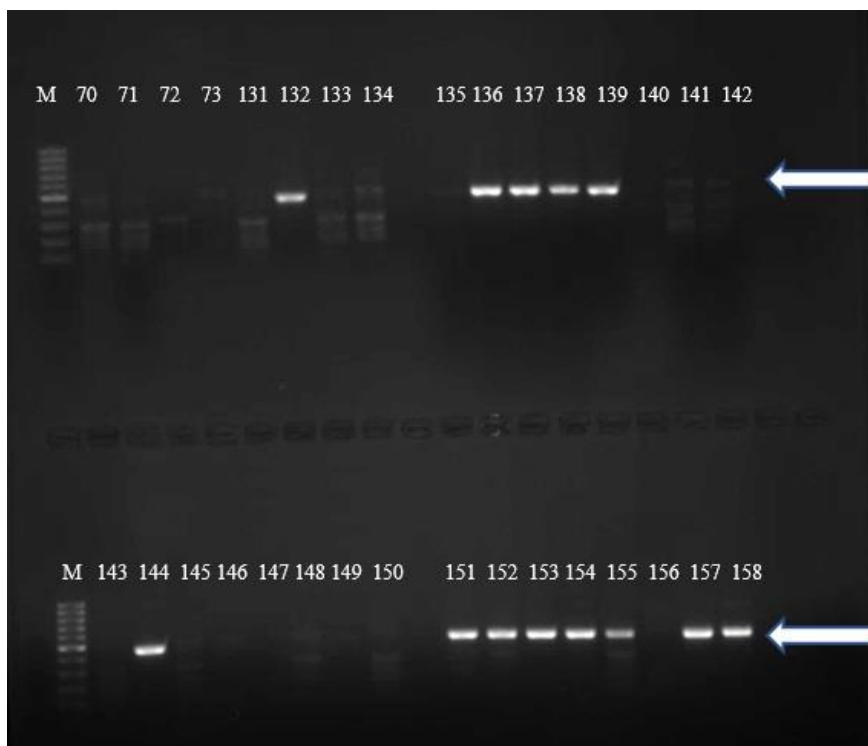
5.2 Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E

Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E nebyl detekován jak v produkční výsadbě, tak ani v planě rostoucích bezech pocházejících z bezprostředního okolí sadu.

5.3 Elderberry aureus virus 1 (EIAV1)

Přítomnost EIAV1 byla zjištěna ve 16,4 % testovaných vzorků, tj. v 14 keřích z 85 keřů.

Z 54 keřů pocházejících z produkční výsadby byl pozitivní pouze jeden keř. Tento keř nevykazoval žádné příznaky. Mimo produkční výsadbu bylo testováno 31 keřů. EIAV1 byl detekován v 13 keřích tj. 41,9 % případů. Celkově 3 pozitivně testované rostliny nevykazovaly žádné příznaky. U zbylých 10 keřů bylo zaznamenáno příznaků jako např. prosychání, mozaika, bílé okraje listů, chloróza, kroužkovitost, blednutí žilnatiny, svinutka listů a světle zelené listy. Směsné infekce byly přítomny pětkrát, z toho vždy u rostlin rostoucích mimo sad. Pozitivní vzorky 132, 137, 138, 154 a 155 byly současně nakaženy CLRV. Vždy se jednalo o rostliny vykazující příznaky.



Obrázek 10: Detekce Elderberry aureus viru 1 pomocí RT-PCR se specifickými primery Aur1F a Aur1R ve vzorcích bezu černého *Sambucus nigra* L.

Legenda: M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100bp DNA ladder, 70–158 – označení jednotlivých vzorků bezu, šipka – označení specifického produktu.

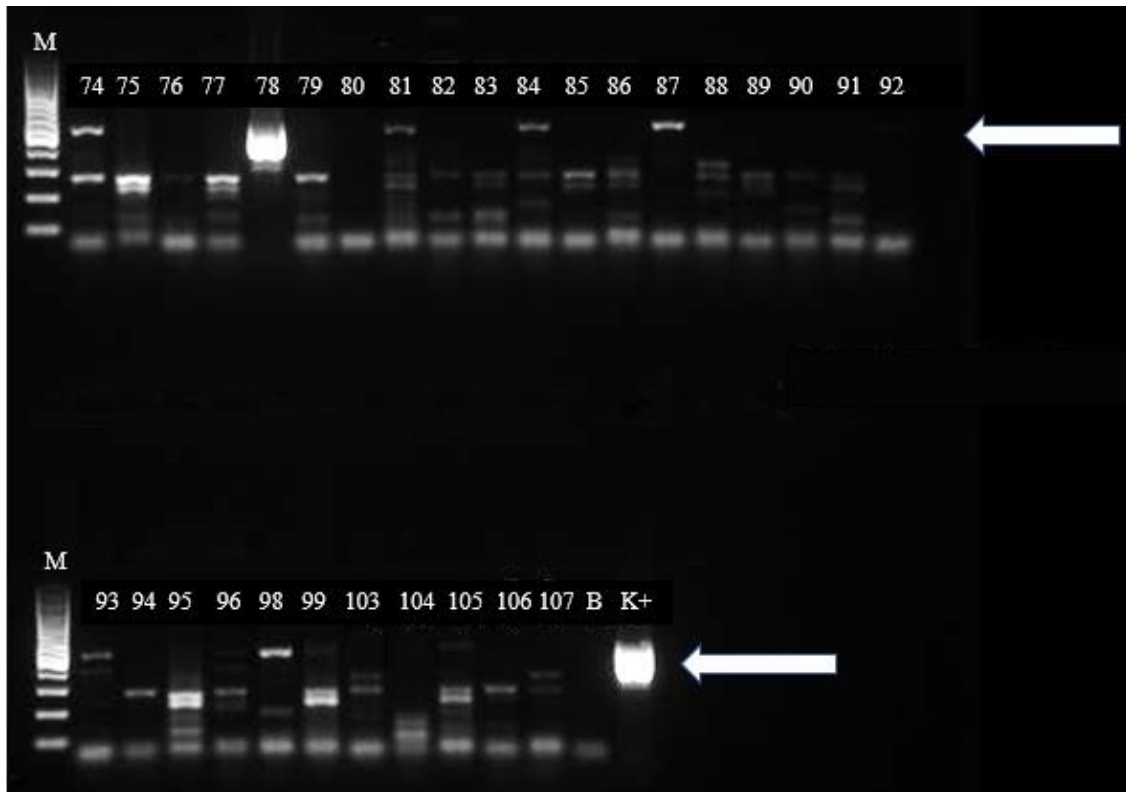
Obrázek 11: Rostlina bezu napadená EIAV1 s příznaky mozaiky a blednutí žilnatiny (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).



5.4 Rhabdovirus

Z 85 testovaných vzorků bezu černého byl pozitivní pouze 1 vzorek. Tento vzorek pocházel z produkční výsadby a byly na něm viditelné příznaky chlorózy, mozaiky a kroužkovitosti. Tento vzorek byl současně nakažen CLRV.

Obrázek 12: Detekce Rhabdovirus pomocí RT-PCR se specifickými primery EB RhabF a EB RhabR ve vzorcích bezu černého *Sambucus nigra* L. (Autor: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).



Legenda: M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, 74–107 – označení jednotlivých vzorků bezu, B – negativní kontrola, K+ – pozitivní kontrola, šipka – označení specifického produktu.



Obrázek 13: Rostlina bezu napadená rhabdovirem a CLRV s příznaky mozaiky, chlorózy a kroužkovitosti (Foto: Mgr. Dana Šafářová, PhD.).

6 DISKUSE

V této bakalářské práci bylo z testovaných vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.) 30,6 % pozitivních na virovou infekci, tj. 26 z 85. 18 pozitivních vzorků pocházelo z plané populace bezu v okolí sadu a 8 vzorků pocházelo z produkční výsadby. Rostliny ze sadu pocházely z udržovacího šlechtění odrůd 'Bohatka' a 'Dana' z 'Výskumný ústav ovocných a okrasných dřevín, a.s.' v Bojnicih na Slovensku. V průběhu udržovacího šlechtění sice nebyly testovány jednotlivé viry, ale materiály byly kontrolovány na výskyt příznaků chorob. Z toho se dá usuzovat, že ve výsadbovém materiálu se nevyskytovaly viry, které vyvolávají příznaky na infikovaných keřích. Je zde tedy předpoklad, že infekce by do sadu mohla být zavlečena právě z planých bezů.

Cherry leaf roll virus je široce rozšířen po celé Evropě a má velký okruh hostitelů. Virus byl detekován například v bříze bělokoré (*Betula pendula* L.) ve Spojeném Království, v třešni ptačí (*Prunus avium* L.) také ve Spojeném Království a v ořešáku královském (*Juglans regia* L.) ve Francii. V bezu černém byl výskyt zaznamenán v Maďarsku, na několika lokacích v Německu (Rebenstorf *et al.*, 2006) a v Polsku (Berniak, 2016). Z testovaných virů v bezu černém (*Sambucus nigra* L.) byl v této bakalářské práci nejčastější výskyt zaznamenán právě u *Cherry leaf roll virus*. Virová infekce způsobená CLRV byla detekována na 20 % testovaných rostlin, z nichž větší polovina pocházela z bezů rostoucích mimo sad. Podobných výsledků bylo zaznamenáno i v Polsku, kde CLRV byl také nejrozšířenějším detekovaným virem v bezu, byl nalezen především na planých rostlinách bezu černého (Berniak, 2016). CLRV byl v této bakalářské práci přítomen pouze v příznakových rostlinách. Jelikož je to velmi často se vyskytující virus u bezu černého, měl by být z udržovaného šlechtění vyloučen, právě z důvodu vyvolávání jednoznačných příznaků (Rebenstorf *et al.*, 2006; Berniak, 2016; Ho *et al.*, 2016; Šafářová *et al.*, 2018). Co se týče přenosu CLRV, tak doposud nebyl zaznamenán přenos hád'átky nebo hmyzem. U bezu byl potvrzen přenos pylem, semeny a mechanickou inokulací. Interspecifický přenos viru se předpokládá s velmi nízkou frekvencí (Rebenstorf *et al.*, 2006; Massalski *et al.*, 1984). CLRV byl pravděpodobně přenesen pylem do produkční výsadby z planě rostoucích keřů. Mezi planými keři mohl být CLRV rozšířen i semeny. Avšak tyto způsoby přenosu mezi produkční výsadbou a planými keři a mezi planými keři navzájem je nutné experimentálně prokázat. U CLRV se dá předpokládat, že u rodu *Sambucus* je běžný výskyt ve smíšených infekcích. V 6 rostlinách ze 17, ve kterých byl detekován *Cherry leaf roll virus*, byla přítomna smíšená

virová infekce. Ho *et al.* (2016) CLRV detekovali také ve vzorcích rodu *Sambucus* dohromady s jiným virovým onemocněním. Šafářová *et al.* (2018) také potvrdili výskyt CRLV ve směsné infekci u rostlin bezu černého.

O výskytu Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E není mnoho informací. Virus byl především detekován v rostlinách poddruhu bezu černého *Sambucus nigra* subsp. *canadensis* L. pocházejících z USA a v bezu červeném (*Sambucus racemosa* L.) původem z Japonska a Uzbekistánu (Ho *et al.*, 2016). V roce 2018 byl zaznamenán výskyt EIVA–E v bezu černém (*Sambucus nigra* L.) na území České republiky, a to konkrétně na 9 lokalitách (Vavroušková, 2018). Šafářová *et al.* v roce 2018 při detekci Elderberry aureus virus 1 v České republice zaznamenali velmi vysokou frekvenci výskytu EIVA–E právě ve směsné infekci s EIAV1. Avšak na lokalitě testované v této bakalářské práci nebyl Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E přítomen.

Elderberry aureus virus 1 je nedávno objeveným virem, který byl poprvé detekován v rostlinách bezu černého v České republice. Vzorky bezu pocházely z planých rostlin z 12 lokalit ze 3 regionů ČR (Šafářová *et al.*, 2018, Vavroušková, 2018). Z testovaných rostlin v této bakalářské práci byl EIAV1 detekován na 16,4 % (tj. 14 z 85 keřů), z toho pouze jeden vzorek pocházel ze sadu, ostatní pozitivní vzorky pocházely z plané populace bezu v okolí sadu. Za předpokladu, že se jedná o nově se vyskytující virové onemocnění je možné, že v produkční výsadbě virus zatím nebude příliš rozšířen, jelikož cílem produkční výsadby by měly být zdravé rostliny. Avšak tyto informace by bylo potřeba dále ověřit. Způsob přenosu EIAV1 není znám. Příbuzným virem Elderberry aureus virus 1 je *Pothos latent virus*, který by měl být přenosný mechanickou inokulací a háďátko (Chen *et al.*, 2016). Šafářová *et al.* (2018) dále uvádí, že příznaky způsobené EIAV1 byly slabé nebo se příznaky nevyskytovaly a uvádí, že na rostlinách, kde byly příznaky infekce většinou rozsáhlejší, byla přítomna smíšená virová infekce nejčastěji s Elderberry carlavirus A, -B, -C, -D, -E a *Cherry leaf roll virus*. Výskyt Elderberry aureus virus 1 ve smíšených infekcích je potvrzen i v rámci této bakalářské práce, kdy na 5 pozitivně testovaných rostlinách na EIAV1 ze 14 byl přítomen EIAV1 v kombinaci *Cherry leaf roll virus*. Vždy se jednalo o rostliny s příznaky. V této bakalářské práci byl v produkční výsadbě EIAV1 detekován pouze v jedné asymptomatické rostlině, u planě rostoucích bezů v bezprostředním okolí sadu byl EIAV1 detekován u 3 asymptomatických rostlin ze 13. U asymptomatických rostlin se ani v jednom případě nejednalo o směsnou infekci. Rhabdovirus testovaný v této bakalářské práci je úplně novým virem, o kterém nejsou dostupné žádné informace. Byl detekován v jednom vzorku pocházejícím ze sadu. Tato pozitivně

testovaná rostlina projevovala příznaky jako chloróza, mozaika a kroužkovitost a byla zde přítomna smíšená infekce v kombinaci s *Cherry leaf roll virus*.

7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo testováno 85 rostlin bezu černého (*Sambucus nigra* L.) pocházejících ze sadu Agrofrukt v Hustopečích a jeho okolí. Byl proveden průzkum výskytu virů na bezu černém v produkční výsadbě a v planě rostoucích keřích v bezprostředním okolí sadu. Ve výsadbě se vyskytoval na příznakových rostlinách především *Cherry leaf roll virus*. Rhabdovirus a Elderberry aureus virus 1 se ve výsadbě vyskytovaly pouze ojediněle, kdy Rhabdovirus byl detekován na příznakové rostlině a EIAV1 byl detekován na bezpříznakové rostlině. V planých rostlinách byl detekován *Cherry leaf roll virus* a Elderberry aureus virus 1. CLRV se vždy vyskytoval na příznakových rostlinách. EIAV1 se vyskytoval i na bezpříznakových. U smíšených infekcí EIAV1 a CLRV byly příznaky vždy přítomny. Celkově bylo infikováno 30,6 % rostlin. CLRV bylo nakaženo 20 %. EIAV1 bylo nakaženo 16,4 %. Je zde předpoklad zavlečení CLRV a EIAV1 do produkční výsadby, proto by měl být sledován jejich přenos, který by měl být podroben důkladnému výzkumu. Také by měla být prováděna pravidelná detekce u příznakových a bezpříznakových rostlin. U příznakových rostlin se totiž nemusí vždy jednat o virovou infekci. Podobné příznaky mohou vyvolávat také houbové patogeny.

8 LITERATURA

- ABELLEIRA, A., MANSILLA, J. P., PADILLA, V., HITA, I., CABALEIRO, C., BERTOLINI, E., OLMOS, A., LEGORBURU, E. J. (2010): First Report of *Arabis mosaic virus* on Grapevine in Spain. *Disease Notes* 94(5): 635.
- APPLEQUIST, W. L. (2015): A Brief Review of Recent Controversies in the Taxonomy and Nomenclature of *Sambucus nigra* sensu lato. *Acta Horticulturae* 1061: 25–33.
- BABOS, P., KASSANIS, B. (1963): Serological relationships and some properties of *Tobacco necrosis virus* strains. *Journal of General Microbiology* 32: 135–144.
- BERNIAK, H. (2016): Partial characterization of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates infecting *Sambucus* spp. Plants in Poland. *Acta Scientiarum Polonorum* 15: 55-63.
- BERTOLINI, E., OLMOS, A., LOPÉZ, M. M., CAMBRA, M. (2003): Multiplies nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of RNA four viruses and *Oseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive trees. *Phytopatology* 93: 286-292.
- BORCEAN, A., DAVID, G. (2017): Aspects about fungus *Ramularia sambucina* attack reported on elderberries (*Sambucus nigra*) between 2013–2016. *Issue* 61: 479–484.
- Bristow, P. R., Martin, R. R., and Windom, G. E. 2000. Transmission, field spread, cultivar response, and impact on yield in highbush blueberry infected with Blueberry scorch virus. *Phytopathology* 90: 474–479.
- BUCHTOVÁ, I. (2017): Situační a výhledová zpráva ovoce. Ministerstvo zemědělství. Praha.
- BUCHTOVÁ, I. (2018): Situační a výhledová zpráva ovoce. Ministerstvo zemědělství. Praha.
- BYERS, P. L., THOMAS, A. L., GOLD, M. A., CERNUSCA, M. M., GODSEY, L. D. (2014): Growing and Marketing Elderberries in Missouri. *Agroforestry in Action*. The Center for Agroforestry, University of Missouri.
- CADMAN, C. H. (1960): Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe. *Virology*: 11(4): 653–664.
- CERNUSCA, M., GOLD, M., GODSEY, L. (2011): Elderberry Market Research. The Centre for Agroforestry. University of Missouri.
- CIUFFO, M., PETTITI, D., GALLO, S., MASENGA, V., TURINA, M. (2005): First report of *Blueberry scorch virus* in Europe. *Plant Pathology* 54(4): 565–565.
- CUADRADO, I. M., GUERRA-SANZ, J. M., GARCIA, C., AGUILAR, M. I., MORENO, P. (1995): First report of *Tomato bushy stunt virus* in Almeria (Spain). *Plant Disease* 79: 1186.

DOI Y., TERANAKA M., YORA K., ASUYAMA H. (1967) Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259–266.

DONOGHUE, M. J., ERIKSSON, T., REEVES, P. A., OLMSTEAD, R. G. (2001): Phylogeny and phylogenetic taxonomy of *Dipsacales*, with special reference to *Sinadoxa* and *Tetradoxa* (*Adoxaceae*). *Harvard Papers in Botany* 6: 459–479.

FEJER, J., SALAMON, I., GRULOVA, D., MICHALEK, S., ZVALOVA, M. (2015): Elderberry (*Sambucus nigra*) Cultivation in Slovak Republic and Identification and Quantification of Anthocyanins. *Acta Horticulturae* 1061: 253–258.

FILIPPIN, L., ANGELINI, E., BORGO, M. (2008): First identification of a phytoplasma infecting *Cornus sanguinea* and *Sambucus nigra*. *Plant Pathology* 57(6): 1175–1175.

FINN, C.E., THOMAS, A.L., BYERS, P.L., KEMAL, M. (2008): Evaluation of American (*Sambucus canadensis*) and European (*S. nigra*) Elderberry Genotypes Grown in Diverse Environments and Implications for Cultivar Development. *HortScience* 43(5):1385–1391.

GONZÁLEZ, J. A., RODICIO, M. R., MENDOZA, M. C. (2003): Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2936–2941.

HEJNÝ, S., SLAVÍK, B. (1997): Květena České republiky 1. Akademia. Praha.

HLUCHÝ, M., ACKERMANN, P., ZACHARDA, M., BAGAR, M., JETMAROVÁ, E., VANEK, G. (1997): *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné. Ochrana ovocných dřevin a révy vinné v integrované produkci.* Biocont Laboratory. Brno.

HO, T., QUITO-AVILLA, D., KELLER, K. E., POSTAM, J. D., MARTIN, R. R., TZANETAKIS, J. E. (2016): Evidence of sympatric speciation of elderberry carlaviruses. *Virus Research* 215: 72–75.

HORÁČEK, P. (2007): *Encyklopedie listnatých stromů a keřů.* Computer Press a. s. Brno.

CHARLEBOIS, D. (2007): Elderberry as a medicinal plant. In: Janick, J., Whypkey, A., editors: *Issues in new crops and new uses.* Alexandria, VA: ASHS. 284–292.

CHEN, C., ZUCKERMAN, D. M., BRANTLEY, S., SHARPE, M., CHILDRESS, K., HOLCZYK, E., PENDLETON, A. R. (2014): *Sambucus nigra* extracts inhibit infectious bronchitis virus at an early point during replication. *BMC Veterinary Research* 10:24.

- CHEN, Y. K., CHANG, Y. S., CHAO, H. Y. (2016): Identification and Characterization of *Pothos latent virus* Causing Necrotic Ringspots and Line Patterns on Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in Taiwan. *Journal of Phytopathology* 164(9): 650–658.
- JHA, A., POSNETTE, A. F. (1961): Transmission of *Arabis moasic virus* by nematode *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.). *Virology* 13(1): 119 – 123.
- JONES, A. T. (1972): Purification and properties of elderberry latent virus, one of four sap-transmissible viruses obtained from American elder (*Sambucus canadensis* L.). *Annals of Applied Biology* 70(1): 49–58.
- JONES, A. T., MCGAVIN, W. J., BRUNT, A. A., PHILLIPS, S. (2000): *Elderberry latent virus*: its relationship to *Pelargonium ringspot virus* and its identification as a distinct member of the genus *Carmovirus*, family *Tombusviridae*. *Annals of Applied Biology* 136(2): 147–152.
- KALINOWSKA, E., PADUCH-CICAL, E., CHODORSKA, M. (2013): First report of *Bluberry scorch virus* in elderberry in Poland. *Plant Disease* 97:1515.
- KAPLAN, J. (2011): Černý bez v produkčním ovocnářství – II. Díl. *Zahradnictví* 9:2011.
- KASSANIS, B., MACFARLANE, I. (1965): Interaction of virus strain, fungus isolate, and host species in the transmission of *Tobacco necrosis virus*. *Virology* 26(4): 603–612.
- KELLER, K. E., MOSIER, N. J., THOMAS, A. L., QUITO-AVILLA, D. F., MARTIN, R. R. (2015): Identification of two new carlaviruses in elderberry. *Acta Horticulturae* 1061: 161–164.
- KOBLÍŽEK, J. (2000): Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. Sursum. Tišnov.
- KOLAŠÍNOVÁ J. (2014): Patogeny bezu černého (*Sambucus nigra* L.), jejich význam a možnosti ochrany. Diplomová práce. Agronomická fakulta, Mendelova univerzita, Brno.
- KOMOROWSKA, B., PTASZEK, M., JARECKA-BONCELA A., HASIÓW-JAROSZEWSKA, B. (2018): First Report of *Arabis Mosaic Virus* in Rhubarb in Poland. *Disease Notes* 102(9).
- KORBELÁŘ, J., ENDRIS, Z. (1968): Naše rostliny v lékařství. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha.
- KŮDELA, V., BARTOŠ, P., ČAČA, Z., DIRLBK, J., FRIČ, F., LEBEDA, A., ŠEBESTA, J., ULRYCHOVÁ, M., VALÁŠKOVÁ, E., VESELÝ, D. (1989): *Obecná fytopatologie*. Academia. Praha.
- LISTER R. (1964): *Strawberry latent ringspot*: a new nematode – borne virus. *Annals of Applied Biology* 54: 167–176.

- LIU, H. Y., SEARS, J. L., OBERMEIER, C., WISLER, G. C., RYDER, E. J., DUFFUS, J. E., KOIKE, S. T. (1999): First report of *Tomato bushy stunt virus* isolated from lettuce. *Plant Disease* 83(3): 301.
- LOWERY, D. T., FRENCH, C. J., BERNARDY, M. (2005): *Nicotiana occidentalis*: A New Herbaceous Host for *Blueberry scorch virus*. *Plant Disease* 89(2): 205.
- MASSALSKI, P. R., COOPER, J. I. (1984): The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut and cherry naturally infected with cherry leaf roll virus and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant Pathology* 33(2): 255–262. In: Schimanski, H. H., Schmelzer, K. (1972): Contribution to the knowledge of the transmissibility of cherry leaf roll virus by seeds of *Sambucus racemosa* L. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 127:673–675.
- MILIČIĆ D., PLAVŠIĆ B., GRBEJA J., ERIĆ Z. (1987): *Cherry leaf roll virus* and Elderberry carlavirus of *Sambucus nigra* L. in South – East Europe. *Acta Botanica Croatica* 46(1): 1–8.
- MISHCHENKO L., DUNICH A., TARAN O., GLUSHCHENKO L. (2016): Detection of the Pathogen of Viral Disease in *Sambucus Nigra* Plants, *БИОЛОГИЯ (Biology)* 2(72).
- MŁYNARCZYK, K., WALKOWIAK-TOMCZAKA, D., ŁYSIAKB, G. P (2018): Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. As a Functional Ingredient for Food and Pharmaceutical Industry. *Journal of Functional Foods* 40: 377–390.
- MOHAN, S. K., BIJMAN, V. P. (2000): Two *Xanthomonad Pathogens*, One from *Acer glabrum* and One from *Sambucus nigra*. In: De Boer, H. S., editors: *Plant Pathogenic Bacteria*. Springer Science+Business Media. Dordrecht. pp. 131–134.
- MUELLER, W. C. (1967): *Tobacco mosaic virus* obtained from diseased Wisteria and elder. *Plant Disease Reports* 51: 1053.
- NAVRÁTIL, M., FIALOVÁ, R. (2008): *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc.
- NAWAZ, H. H., UMER, M., BANO, S., USMANI, A., NASEER, M. (2014): A research review on *Tomato bushy stunt virus* disease complex. *Journal of Natural Science Research* 4(5): 18–23.
- PLAVŠIĆ-BANJAC, B., MILIČIĆ, D. (1968): Neke nove viroze drveća u Jugoslaviji (Some new virus diseases of trees in Yugoslavia). *Mikrobiologija* 5: 65–72.
- POLÁK, Z., PROCHÁZKOVÁ, Z., BRANIŠOVÁ, H. (1990): Recent findings of viruses of forest trees on the territory of the Czech Republic. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 26(4): 389–393.

- PORTER, R. S., BODE, R. F. (2017): A Review of the Antiviral Properties of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) Products. *Phytotherapy Research* 31(4): 533–554.
- POSPIESZNY H, BORODYNKO N, JOŃCZYK M. (2004): First report of *Tomato black ring virus* (TBRV) in the natural infection of *Sambucus nigra* in Poland. *Journal of Plant Protection Research* 44 (4): 373–376.
- REBENSTORF, K., CANDRESSE, T., DULUCQ, M. J., BUTTNER, C., OBERMEIER, C. (2006): Host Species-Dependent Population Structure of a Pollen-Borne Plant Virus, Cherry Leaf Roll Virus. *Journal of Virology* 80(5): 2453–2462.
- ŠAFÁŘOVÁ D., CANDRESSE T., NAVRÁTIL M. (2017): Complete genome sequence of a novel bromovirus infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.) in the Czech republic. *Archives of virology* 163: 567–570.
- ŠAFÁŘOVÁ, D., VAVROUŠKOVÁ, K., CANDRESSE, T., NAVRÁTIL, M. (2018): Molecular characterization of a novel Aureusvirus infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.). *PLOS ONE* 13(8).
- UYEMOTO J. K. (1970): Symptomatically distinct strains of *Tomato ringspot virus* isolated from grape and elderberry. *Phytopatology* 60: 1838–1841.
- UYEMOTO, J. K., GILMER, R. M., WILLIAMS, E. (1971): Sap-transmissible viruses of elderberry in New York. *Plant Disease Reporter* 55: 913 – 913.
- VAN LENT J. W. M., WIT A. J., DIJKSTRA J. (1980): Characterization of a carlavirus in elderberry (*Sambucus* spp.). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 86(2): 117–34.
- VAVROUŠKOVÁ K. (2018): Charakteristika zástupců rodu *Carlavirus* infikující bez černý (*Sambucus nigra* L.). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- VEBERIC, R., JAKOPIC, J., STAMPAR, F., SCHMITZER, V. (2009): European Elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry* 114: 511–515.
- VIDAVER, A. K., LAMBRECHT, P. A. (2004): Bacteria as plant pathogens. *The Plant Health Instructor*.
- VILLAMOR, D. E. V., EASTWELL, K. C. (2016): *Sambucus nigra* subsp. *caerulea* and *Malva* spp.: Newly Identified Hosts of *Cherry rasp leaf virus*. *Disease Notes* 102(9).
- WAY, D. R. (1981): Elderberry Culture in New York State. *New York's Food and Life Science Bulletin* 91.

WEGENER, L. A., PUNJA, Z. K., MARTIN, R. R. (2004): First Report of *Blueberry scorch virus* in Cranberry in Canada and the United States. *Plant Disease* 88(4): 427.

Internetové zdroje

American Phytopatology Society, 2019. [online] [navštíveno dne 23.3.2019] Dostupné z: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/Cucumbermosaic.aspx>

Botanická zahrada Výstaviště Flora Olomouc, 2018. [online] [navštíveno dne 9.12.2018] Dostupné z: <http://botanickazahrada-ol.blog.cz/1709/brevne-plody-drevin-bez-cerny>

Description of Plant Viruses, 2019. [online] [navštíveno dne: 23.3.2019] Dostupné z: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=370>

EPPO, 2018a. [online] [navštíveno dne 15.11.2018] Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/PHYPSO/distribution>

EPPO, 2018b. [online] [navštíveno dne 6.11.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/COLLAC>

EPPO, 2019a. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/BLSCV0/distribution>

EPPO, 2019b. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/CMV000/distribution>

EPPO, 2019c. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/CLRV00/distribution>

EPPO, 2019d. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/distribution>

EPPO, 2019e. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/TBRV00/distribution>

EPPO, 2019f. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/TORSV0>

EPPO, 2019g. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/CRLV00/distribution>

EPPO, 2019h. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/SLRSV0/distribution>

EPPO, 2019i. [online] [navštíveno dne 19.2.2018]

Dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/TBSV00/distribution>

ICTV, 2019. [online] [navštíveno dne 20.3.2019] Dostupné z: <https://talk.ictvonline.org/>

Květena ČR, 2018. [online] [navštíveno dne 6.11.2018]

Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=577>

Mapy.cz, 2019. [online] [navštíveno dne 5.4.2019] Dostupné z: <https://mapy.cz/>

Statistik Austria (2017): Obsternte 2017 nach Bundesländern. [online] [navštíveno dne 6.11.2018] Dostupné z :

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/agrarstruktur_flaechen_ertraege/obst/index.html

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2018): Land- und Forstwirtschaft, Fischerei. [online] [navštíveno dne: 6. 11. 2018] Dostupné z:

<https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/ObstGemueseGartenbau/Strauchbeerenanbau.html>

ViralZone, 2019. [online] [navštíveno dne 20.3.2019] Dostupné z: <https://viralzone.expasy.org/>