

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Tomáš Zemánek

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



dsRNA pre stanovenie virómu rastlín

(Detekcia karlavírusov bazy čiernej pomocou sekvenovania novej generácie)

Diplomová práce

Bc. Tomáš Zemánek

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2017

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

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora:	Tomáš Zemánek
Názov práce:	dsRNA pre stanovenie virómu rastlín
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedúci práce:	prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Diplomová práca sa venuje detekcii a charakterizácii virómu bazy čiernej. V teoretickej časti je najprv komplexne charakterizovaný pojem viróm, ďalej sa zaoberá detekciou rastlinných vírusov, rastlinnou metagenomikou, technológiami sekvenovania novej generácie a ich aplikáciami v rastlinnej virológii. Experimentálna časť práce sa zaoberá detekciou a charakteristikou vírusov infikujúcich bazu čiernu v Českej republike. Vo vzorke s označením B2 bola detekovaná zmesná infekcia vírusmi <i>Elderberry carlavirus A</i> a <i>Elderberry carlavirus B</i> .
Kľúčové slová:	dsRNA, baza čierna, Elderberry carlavirus A, Elderberry carlavirus B, sekvenovanie novej generácie (NGS), Illumina, rastlinný viróm
Počet strán:	49
Jazyk:	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Tomáš Zemánek

Title: dsRNA for plants virome determination

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.

The year of presentation: 2017

Abstract: This master's thesis deals with detection and characterization of Elderberry virome. The theoretical part at first comprehensively defines the term virome, then deals with detection of plant viruses; plant metagenomics; Next-generation sequencing Technologies and their applications in plant virology. The experimental part deals with detection and characterization of viruses infecting Elderberries in Czech republic. Mixed infection with *Elderberry Carlavirus A* and *Elderberry Carlavirus B* was detected in the sample labelled as B2.

Keywords: dsRNA, Elderberry, Elderberry carlavirus A, Elderberry carlavirus B, Next-generation sequencing (NGS), Illumina, plant virome

Number of pages: 49

Language: Slovak

Prehlasujem, že diplomovú prácu „dsRNA pre stanovenie virómu rastlín“ som vypracoval samostatne pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP Olomouc s použitím literatury uvedenej v závere práce.

V Olomouci

.....

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcemu mojej diplomovej práce prof. RNDr. Milanovi Navrátilovi CSc. za trpezlivosť a ústretový prístup pri konzultáciách v priebehu spracovávaní práce. Ďalej patrí moje poďakovanie Mgr. Dane Šafářovej Ph.D. a p. Jane Veselskej za pomoc a cenné rady pri práci v laboratóriu a so špecializovaným softvérom. Ďakujem Interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA_ PrF_2016_003) za podporu.

Obsah

1. Ciele práce	7
2. Úvod	8
3. Literárny prehľad	9
3.1 Čo je to viróm	9
3.2 Ľudský viróm	10
3.3 Viróm živočíchov	11
3.4 Viróm rastlín	14
3.4.1 Metagenomika a rastlinné vírusy	15
3.4.2 Detekcia rastlinných vírusov	16
3.4.3 Sekvenačné technológie novej generácie (NGS)	19
3.4.4 Aplikácie NGS technológií v rastlinnej virológii	21
3.5 Globálny viróm	26
4. Materiál a metódy	27
4.1 Biologický materiál	27
4.2 NGS sekvenovanie	27
4.2.1 Izolácia dsRNA	27
4.2.2 Vlastné sekvenovanie	28
4.2.3 Analýza sekvencií	28
5. Použité prístroje, roztoky a chemikálie	29
5.1 Použité prístroje	29
5.2 Použité roztoky a chemikálie	29
6. Výsledky	30
6.1 NGS sekvenovanie	30
7. Diskusia	35
8. Záver	39
9. Zoznam použitej literatúry	40
10. Internetové zdroje	49

Zoznam použitých skratiek

16S rRNA	ribozomálna RNA so sedimentačným koeficientom 16S
Acc. No.	Prístupové (databázové) číslo (accession number)
BAC	umelý bakteriálny chromozóm (bacterial artificial chromosome)
BIScV	Blueberry scorch virus
bp	páry bází (base pairs)
cDNA	komplementárna DNA
CMV	Cucumber mosaic virus
COI	cytochróm c oxidáza podjednotka 1
CPMMV	Cowpea mild mottle virus
cpDNA	DNA plášťového proteínu
cSNP	kódujúci polymorfyzmus v jednom nukleotide
CuLCrV	Cucurbit leaf crumple virus
CYDV	Cereal yellow dwarf virus
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	dvojvláknová DNA (double-stranded DNA)
dsRNA	dvojvláknová RNA (double-stranded RNA)
EIBSV	Elderberry symptomless virus
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EIVA	Elderberry carlavirus A
EIVB	Elderberry carlavirus B
EIVC	Elderberry carlavirus C
EIVD	Elderberry carlavirus D
EIVE	Elderberry carlavirus E
g	miera pret'azenia v násobkoch zemskej tiaže
gDNA	genómová DNA
GFRV	Grapevine fanleaf virus
GINV	Grapevine inner berry virus
GLRaV-3	Grapevine leafroll-associated virus 3
GRSPaV	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus
GRVfV	Grapevine rupestris vein feathering virus
GSyV-1	Grapevine Syrah virus 1

GVA	Grapevine virus A
GVE	Grapevine virus E
GYSVd1	Grapevine yellow speckle viroid 1
HIV	Human immunodeficiency virus
HSVd	Hop stunt viroid
HvEV	Hordeum vulgare endornavirus
ChIP	chromatínová imunoprecipitácia
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
ITS	Internal transcribed spacer
kb	kilobáza (kilobase)
Mbp	megabáza (mega base pairs)
MeDIP	imunoprecipitácia metylovanej DNA (Methylated DNA Immunoprecipitation)
miRNA	mikro RNA
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriálna DNA
ncRNA	nekódujúca RNA
NGS	sekvenovanie novej generácie (Next-generation sequencing)
NSPaV	Nectarine stem pitting associated virus
ORF	otvorené čítacie rámce (open reading frames)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PepMV	Pepino mosaic virus
PMTV	Potato mop-top virus
PSTVd	Potato spindle tuber viroid
PSV	Peanut stunt virus
qPCR	kvantitatívna PCR (quantitative PCR)
RACE	rapid amplification of complementary DNA ends
rbcL	veľká podjednotka ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxylázy
RdRp	RNA-dependentná RNA polymeráza
RIN	RNA Integrity Number
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rpm	počet otáčok za minútu (revolutions per minute)

RRBS	bisulfidové sekvenovanie so zníženým zastúpením
rRNA	ribozomálna RNA
RT	reverzná transkripcia
SDS	dodecylsírán sodný
siRNA	malé interferujúce RNA
SIV	Simian immunodeficiency virus
smRNA	malé RNA
SMRT	single molecule real time sequencing
SPCSV	Sweet potato chlorotic stunt virus
SPFMV	Sweet potato feathery mottle virus
spp.	druhy (species)
ssDNA	jednoreťazcová DNA
ssRNA	jednoreťazcová RNA
STE	Tris-chlorid sodný EDTA pufor (Sodium Chloride-Tris-EDTA buffer)
TAV	Tomato aspermy virus
TCV	Turnip crinkle virus
TGB	Triple gene block
TSV	Tobacco streak virus
VEM	metagenomická analýza vektora (Vector-enabled metagenomics)
WGBS	celogenómové bisulfidové sekvenovanie

1. Ciele práce

Cieľom diplomovej práce bolo:

- Vypracovanie literárneho prehľadu na tému „dsRNA pre stanovenie virómu rastlín“ s dôrazom na rastlinný viróm a sekvenovanie novej generácie.
- Získanie nukleotidových sekvencií vírusových izolátov prítomných v rastlinných vzorkách s využitím sekvenovania novej generácie.
- Zaradenie vírusových izolátov do príslušných skupín na základe sekvenáčnych a fylogenetických analýz.

2. Úvod

Viróm je súbor všetkých vírusov prítomných v organizme hostiteľa, jeho skúmaním možno získať komplexné informácie a zvoliť adekvátne regulačné opatrenia, respektíve vhodnú liečbu. Preto je štúdium virómu stále častejšou témou, či už v ľudskom, živočíšnom, alebo rastlinnom výskume. Rastlinné vírusy predstavujú významný faktor hlavne pri pestovaní hospodársky významných rastlín a zamedzenie ich prenosu často predstavuje jedinou možnosť ako pokryť dopyt po potravinových plodinách ako sú napríklad pšenica, jačmeň a ryža, ale aj rastlinách so všestranným využitím, akou je napríklad baza čierna. Najvhodnejšou metódou štúdia rastlinného virómu je sekvenovanie novej generácie, ktoré je limitované predovšetkým harvérovými obmedzeniami a finančnou náročnosťou celej analýzy. Napriek tomu však zažíva prudký rozmach. Jedným z možných prístupov štúdia virómu touto metódou je izolácia dsRNA, táto je následne prepísaná do cDNA, z ktorej sú ďalej konštruované sekvenačné knižnice a tieto sú nakoniec sekvenované.

3. Literárny prehľad

3.1 Čo je to viróm

Slovo viróm vzniklo odvodením zo slov vírus a genóm, prvýkrát bolo použité v roku 2003 pri popise možnosti sledovania ľudského virómu resp. súboru vírusov cirkulujúcich v ľudských populáciách (Anderson *et al.*, 2003). S kľúčovým slovom viróm uvádza databáza Web of Science (https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=T24toe98mK5Cn8BWmOP&preferencesSave) k 4. novembru 2016 päťsto šesťdesiat päť publikácií. Viróm možno definovať ako súbor vírusových organizmov žijúcich v organizme hostiteľa (Lederberg, 2000; Wylie *et al.*, 2012a; Virgin, 2014). O viróme existuje v súčasnosti oveľa menej informácií než o bakteriálnom mikrobióme. Hlavným dôvodom tohto faktu je skutočnosť, že prirodzené životné prostredie bakteriálneho mikrobiómu je prevažne extracelulárne, kým viróm prežíva len vo vnútri buniek, pretože vírusy nie sú kultivovateľné *in vitro*, táto skutočnosť ich činí ťažšie prístupnými experimentálnej analýze. Výskum bakteriálneho mikrobiómu je vo veľkej miere založený na sekvenovaní bakteriálnych ribozomálnych génov bežne dostupnými metódami. Izolácia vírusových nukleových kyselín z buniek a ich následná sekvenácia je však zložitejšia a náročnejšia (Woolhouse *et al.*, 2008). V posledných rokoch sa vďaka pokroku v bioinformatike podarilo vyvinúť metódy na identifikáciu virómu vo veľkých sekvenčných databázach, s čím je spojený rozvoj sekvenačných technológií novej generácie (Next Generation Sequencing; NGS), ktoré sú hlavným zdrojom obrovského množstva týchto dát.

Napriek technickým prekážkam však poznatkov o viróme pribúda. Dôvodom je predovšetkým hlavná téma biomedicínskeho výskumu na začiatku 21. storočia, ktorú možno charakterizovať otázkou: „Čo tvorí molekulárno – genetický základ človeka?“ Prekvapivo sa ukázalo, že za veľkú časť našej biológie a individuality vďačíme mikroorganizmom a vírusom žijúcim v a na našich telách. Toto zistenie sľubuje radikálnu zmenu zásad a praxe v medicíne, oblasti verejného zdravia a základného výskumu (Relman, 2012). Preto sa pozornosť upriamila na nové možnosti ich detekcie a analýzy, čo umožnilo rozvoj metagenomických prístupov umožňujúcich štúdium ľudského virómu, ktorému vďačíme za väčšinu našich doterajších poznatkov.

S rozvojom metód sekvenovania novej generácie, zvyšovaním kapacity a efektivity spolu s poklesom cien sa pozornosť vedeckej komunity zamerala najprv na živočíšny a neskôr i na rastlinný viróm, čomu zodpovedajú aj údaje z databázy Web of Science – z celkového počtu 565 publikácií je na rastlinný viróm zameraných len 39 (platné k 4. novembru 2016).

3.2 Ľudský viróm

Opis ľudského virómu je v porovnaní s dnes dobre popísaným bakteriálnym mikrobiómom relatívne nový a pomerne obmedzený. Niekoľko virómových štúdií ukazuje, že vírusy môžu mať buď prospešné alebo škodlivé účinky na ľudské zdravie v závislosti od ich interakcií s hosťiteľmi, inými vírusmi a baktériami (Foxman *et al.*, 2011; Holtzman *et al.*, 2012; Popović *et al.*, 2012; Wylie *et al.*, 2012b; Minot *et al.*, 2013). Štúdie preukázali, že virómy v slinách, gastrointestinálnom trakte a dýchacích cestách sú odlišné, čo znamená, že lokálne prostredie zohráva zásadnú úlohu pri utváraní ľudských virómov, a tiež ukazujú, že tieto vírusy môžu mať úlohu pri formovaní mikrobiálnej diverzity v ústnej dutine (Pride *et al.*, 2012). Črevné baktérie zásadne vplyvajú na ľudské zdravie a sú zapojené do celého radu patofyziologických procesov, vrátane obezity, zápalových ochorení čriev a kardiovaskulárnych ochorení (Quigley, 2013).

Zistilo sa, že regulácia mikrobiálnej diverzity v zažívacom trakte a systémovom obehu virómom môže mať ďalekosiahle dôsledky. Napríklad bolo pozorované, že špecifická expanzia bakteriofágov u Crohnovej choroby je spojená so znížením bakteriálnej diverzity, čo podporuje myšlienku, že viróm môže prispieť k črevným zápalom a bakteriálnej disbióze (Norman *et al.*, 2015). Ďalej sa dokázalo, že bakteriofágy v čreve by mohli mať vplyv na bakteriálnu flóru, hosťiteľa. Z tohto dôvodu je možné, že by mohli takisto ovplyvňovať bakteriálne funkcie (Abeles *et al.*, 2014). Zistilo sa, že podmnožina črevných baktérií sa podieľa na tvorbe trimetylamínu, metabolitu spojeného s aterosklerózou, pričom je možné, že tento proces by mohli modulovať práve bakteriofágy (Tang *et al.*, 2014).

Aj keď tieto správy upozorňujú na potenciálnu úlohu virómu v oblasti zdravia, odolnosti a chorôb, základné molekulárne a fyziologické mechanizmy týchto účinkov zostávajú do značnej miery neznáme. Projekt ľudského mikrobiómu (Human Microbiome Project; <https://commonfund.nih.gov/hmp/index>) nám umožnil lepšie pochopiť úlohu baktérií v ľudskom tele, a tiež viedol k zisteniu možného významu virómu pre srdce, pľúca, krv a odolnosť voči ochoreniam. Pokroky v technológiách ako metagenomické sekvenovanie a počítačová analýza veľkého množstva sekvenačných dát, možno využiť pre ďalší výskum

ľudského genómu. Jedinečné výzvy, ktorým tento výskum čelí, ako napríklad neexistujúci univerzálny vírusový molekulárny marker (podobný bakteriálnemu 16S rRNA) a heterogénnosť prvkov virómu, zároveň zdôrazňujú potrebu špeciálneho výskumného úsilia (Zou *et al.*, 2016).

Viróm zahŕňa klasické vírusy, ktoré infikujú hostiteľa. Odhaduje sa, že priemerný zdravý človek má vo svojom tele viac ako päť latentných vírusov (Wylie *et al.*, 2014). Ich skutočný počet môže byť ale vyšší, keďže je pravdepodobné, že mnoho komponentov virómu dosiaľ nebolo identifikovaných. Medzi klasické vírusy, ktoré sú často prítomné v ľudskom organizme vo forme latentných infekcií, patria adenovírusy, herpesvírusy a papilomavírusy. Niektoré z týchto vírusových infekcií zostávajú u hostiteľov s normálnym, zdravým imunitným systémom asymptomatické, avšak v organizme s narušenou imunitou dokážu spôsobiť príznaky ochorenia. Do virómu patria taktiež vírusy spôsobujúce chronickú infekciu, o ktorých však nie je známe, či by mohli vyvolať príznaky ochorenia. Medzi takéto „komezálne“ vírusy patria nedávno objavené vírusy rodu *Anellovirus*, ide o DNA vírusy, ktorých prítomnosť bola dokázaná vo vysokom percente ľudskej populácie, a tiež u mnohých druhov zvierat (Bernardin *et al.*, 2010).

Vírusové produkty prítomné v bunkách, vrátane fragmentov vírusových nukleových kyselín a rôznych proteínov vírusového pôvodu, sú takisto súčasťou virómu. Najznámejším príkladom sú endogénne retrovírusy prítomné v chromozómoch, ktoré tvoria okolo 8 % ľudského genómu (Lander *et al.*, 2001). Tieto fragmenty sú výsledkom inzercie retrovirálnej DNA. Väčšina týchto sekvencií prešla v priebehu tisícročí mnohými mutáciami, a preto už nie sú schopné produkovať funkčné vírusové častice. Ľudský gén syncitín, ktorý má pôvod v retrovirálnej inzercii (Pérot *et al.*, 2012), je plne funkčný a hrá úlohu v morfogéneze placenty (Blond *et al.*, 2000). Mutácie v syncitíne boli identifikované u pacientov s roztrúsenou sklerózou a schizofréniou (Karlsson *et al.*, 2001; Antony *et al.*, 2007).

3.3 Viróm živočíchov

Vírusové zoonózy tvoria väčšinu novo objavujúcich sa ľudských vírusových ochorení (Wolfe *et al.*, 2007). Ľudia sú neustále vystavení obrovskému súboru živočíšnych vírusov, ale biologické a epidemiologické prekážky brániace medzidruhového prenosu vírusu sú značné, a preto väčšina vírusov, ktoré infikujú voľne žijúce a domáce zvieratá, nie je ľahko prenosná na človeka (Parrish *et al.*, 2008). Dlhodobý pravidelný kontakt medzi ľuďmi a zvieratami zvyšuje pravdepodobnosť vzniku vírusu prispôbeného k infekcii a replikácii u ľudí, a to

buď priamo alebo prostredníctvom sekundárnych hostiteľov (Morse *et al.*, 2012). Napríklad svine domáce (*Sus scrofa domesticus*) sú významným zdrojom bielkovín na celom svete, ale podliehajú častým vírusovým ochoreniam a početným infekciám, ktoré sú schopné infikovať aj ľudí. Moderné podmienky hospodárenia môžu tiež zvýšiť prenos vírusu a potenciálne rozšírenie zoonózy. Analýza virómu zvierat môže ľahko dokumentovať cirkuláciu známych i nových vírusov, čím uľahčuje detekciu objavujúcich sa vírusov a perspektívne hodnotenie ich patogénneho a zoonotického potenciálu (Shan *et al.*, 2011). Dôkladné pochopenie rozmanitosti vírusov vo voľnej prírode poskytuje taktiež východiskové epidemiologické informácie o potenciálnych patogénoch zvierat a ľudí (van den Brandt *et al.*, 2012). Pre vírusy prenášané medzi zvieratami a ľuďmi sú charakteristické podobné spôsoby prenosu a tkanivový tropizmus, čo možno vidieť na príklade vírusu ľudskej/opičej imunodeficiencie (HIV/SIV). Patogenéza môže byť neprítomná alebo podobná, ale tiež výrazne odlišná, ak sa vírus preniesie na nového hostiteľa.

V roku 2014 sa uskutočnila metagenomická štúdia exkrementov 25 mačiek žijúcich v útulku v Kalifornii. Viac ako 90 % vírusových sekvencií súviselo s vírusmi cicavcov, zvyšok s bakteriálnymi vírusmi. Vo výkaloch boli prítomné vírusy patriace do čeladi *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Herpesviridae*, *Anelloviridae*, *Caliciviridae* a *Picobirnaviridae*. Identifikovalo sa šesť známych vírusov: *Feline coronavirus type 1*, *Felid herpes 1*, *Feline calicivirus*, *Feline norovirus*, *Feline panleukopenia virus* a *Picobirnavirus*. Spolu s nimi boli charakterizované nové druhy astrovírusov a bocavírusov a prvý genóm cyklovírusu u mačiek (Zhang *et al.*, 2014).

Vírusová DNA izolovaná z konských výkalov bola sekvenovaná Sangerovým sekvenovaním, získalo sa 178 140 sekvencií. Z týchto bolo 63 % vírusových, 20 % bakteriálnych, 7 % archeónových, 6 % eukaryotných a 5 % súviselo s mobilnými genetickými elementmi. Z vírusových sekvencií patrilo 59 % čeladi *Siphoviridae*, 26 % doteraz neklasifikovaným fágom, 17 % čeladi *Myoviridae*, 4 % čeladi *Podoviridae* a 2 % rodu *Orthopoxvirus* (Cann *et al.*, 2004).

S využitím metagenomického prístupu sa skúmali exkrementy uškatcov kalifornských (*Zalophus californianus*) rôzneho veku a zdravotného stavu. Boli charakterizované nové, doteraz nepopísané, cicavčie vírusy zo štyroch čeladi RNA vírusov (*Astroviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae* a *Reoviridae*) a jednej čelade DNA vírusov (*Parvoviridae*). Ďalej taktiež prvé úplné alebo čiastočné genómy sapelovírusov, sapovírusov, norovírusov

a bocavírusov týchto morských cicavcov. V najvyššej miere mali zastúpenie astrovírusy a bocavírusy (Li *et al.*, 2011).

Metagenomická analýza exkrementov sviň domácich – 24 zdravých a 12 trpiacich hnačkovitým ochorením, vykonaná v roku 2011, priniesla tieto výsledky: stolica zdravých sviň obsahovala priemerne 4,2 rôznych cicavčích vírusov, zatiaľ čo stolica chorých 5,4 rôznych cicavčích vírusov. 99 % vírusových sekvencií patrilo do čeľadí RNA vírusov *Picornaviridae*, *Astroviridae*, *Coronaviridae* a *Caliciviridae*, len 1 % prináležalo do čeľadí DNA vírusov *Circoviridae* a *Parvoviridae*. Prasacie RNA vírusy identifikované v klesajúcom počte sekvenčných čítaní zahŕňali kobuvírusy, astrovírusy, enterovírusy, sapovírusy, sapelovírusy, koronavírusy, bocavírusy a teschovírusy. Získali sa takmer kompletne genómy mnohých nových druhov prasačích astrovírusov i bocavírusov a súčasne sa charakterizovalo niekoľko malých kruhových DNA genómov kódujúcich replikázové proteíny a 2 vysoko divergentné vírusy radu *Picornavirales* (Shan *et al.*, 2011).

Analýza enterickej vírusovej flóry kún lesných (*Martes martes*) a jazvecov lesných (*Meles meles*) metagenomickým prístupom odhalila nový druh anelovírusu a bocavírusu u kún; nový vírus podobný cirkovírusom a DNA vírus príbuzný s geminivírusmi u jazvecov. Okrem toho boli u oboch detekované sekvencie homológne so sekvenciami vírusov čeľadí *Paramyxoviridae* a *Picornaviridae* (van den Brandt *et al.*, 2012).

Sekvenovaním čiastočne purifikovanej náhodne amplifikovanej vírusovej RNA a DNA z exkrementov 105 voľne žijúcich hlodavcov (myši, hrabošov a potkanov) zozbieraných v Kalifornii a vo Virginii boli identifikované vírusy čeľadí *Circoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Astroviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Adenoviridae* a *Coronaviridae*. Bolo charakterizovaných 17 malých kruhových DNA genómov obsahujúcich 1 alebo 2 replikačné gény vzdialene príbuzné s čeľad'ou *Circoviridae* reprezentujúce niekoľko potenciálne nových vírusových čeľadí. V čeľadi *Picornaviridae* boli charakterizované 2 nové kandidátne rody ako aj vírus blízko geneticky príbuzný ľudskému vírusovému patogénu Aichi. Identifikovali sa fragmenty prvého myšieho sapelovírusu a pikobirnavírusov. Taktiež bol charakterizovaný prvý myší genóm astrovírusu. Podarilo sa osekvenovať genóm myšieho papilomavírusu a fragmenty nového adenovírusu a vírusu asociovaného s adenovírusom. Ďalšiu časť fekálneho virómu hlodavcov tvorili hmyzie vírusy čeľadí *Densoviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, *Dicistroviridae*, *Bromoviridae* a *Virgaviridae*, a tiež rastlinné vírusy čeľadí *Nanoviridae*, *Geminiviridae*, *Phycodnaviridae*, *Secoviridae*, *Partitiviridae*, *Tymoviridae*, *Rodinách Alphaflexiviridae* a *Tombusviridae*,

ktoré odrážajú bežnú stravu hlodavcov – hmyz a rastliny. Fylogenetické analýzy úplných a čiastočných vírusových genómov odhalili mnohé predtým neznáme vírusové druhy, rody a čeľade (Phan *et al.*, 2011).

Vírusy dlhodobo žijúce v určitom hostiteľovi sú typicky dobre prispôsobené a spôsobujú menej výrazné patologické zmeny, avšak patogenéza u nového hostiteľa môže byť okamžite zrejma, čoho príkladom je prenos vírusu eboly z netopierov na človeka. Štúdium niektorých živočíšnych vírusov môže preto poskytnúť nový pohľad na vývoj i históriu ľudských vírusov a v niektorých prípadoch i náhradné modely pre skúmanie prevencie a liečby vírusových ochorení človeka (Wobus *et al.*, 2006; Bukh, 2012; Evans *et al.*, 2013). Okrem tohto môže identifikácia evolučne konzervovaných alebo odlišných genómových oblastí príbuzných vírusov pomôcť pri identifikácii nukleotidových či proteínových sekvencií dôležitých pre vstup, replikáciu, hostiteľskú a tkanivovú špecifitu, imunitnú odpoveď a patogenézu. Pochopenie ochorení zvierat a identifikácia živočíšnych vírusov sú dôležité pre mapovanie zoonotických rezervoárov, objasnenie pôvodu a evolúcie vírusov a vývoj modelových systémov pre dôležité ľudské vírusy. Štúdium virómu zvierat je taktiež účinným spôsobom identifikácie zvieracích homológov ľudských vírusov (Scheel *et al.*, 2015).

3.4 Viróm rastlín

Štúdiu rastlinných vírusov dominovala od počiatku analýza patogénov infikujúcich kultúrne rastliny. Izolácia, charakterizácia a sekvenácia genómu rastlinných vírusov sa neskôr rozšírila o vírusy infikujúce buriny, alebo divokých príbuzných pestovaných, hospodársky významných rastlín. Vírusy a vírusom podobné častice (virus-like particles) v poľnohospodársky nevýznamných rastlinách boli do tej doby objavované náhodne, napríklad ak boli príznaky naznačujúce infekciu pozorované v prírode. Až rozvoj sekvenovania cDNA vo veľkom meradle a v poslednom desaťročí sekvenovanie novej generácie umožnili virológom systematický skrining na prítomnosť známych i úplne nových vírusov v rastlinných populáciách ich vlastnej voľby (Roosinck *et al.*, 2012; Mushegian *et al.*, 2016).

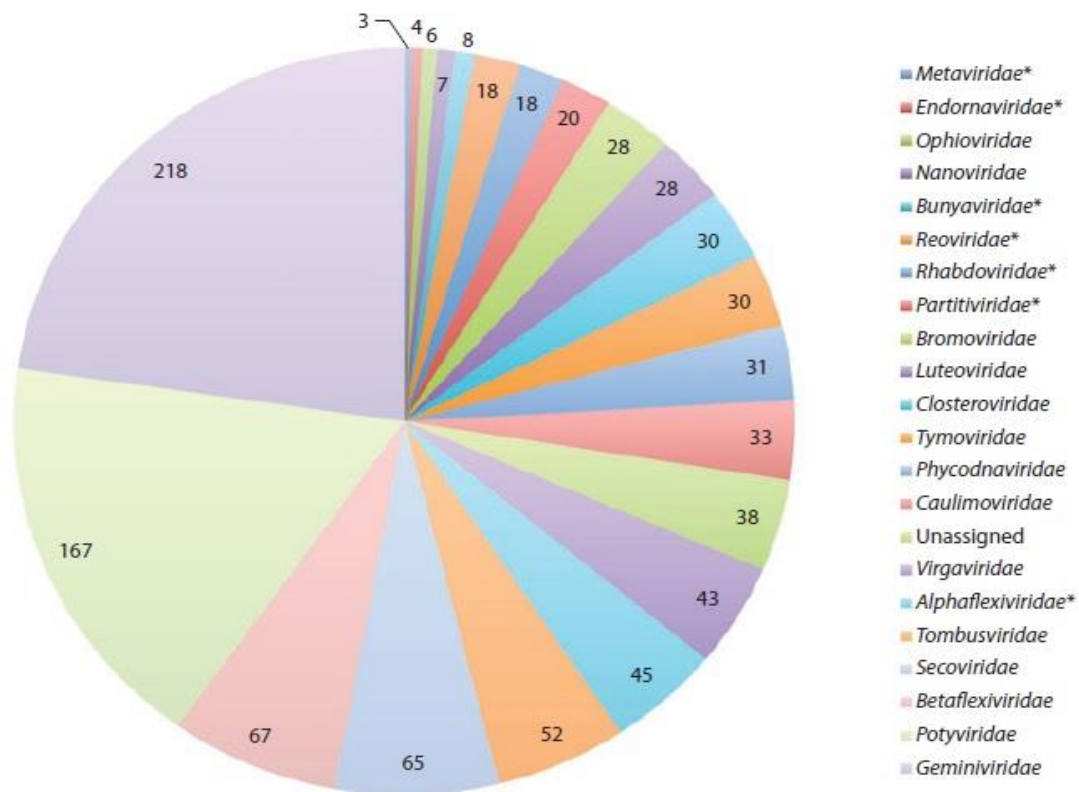
Tieto snahy nám poskytli relatívne dobré znalosti o všeobecnej genómovej diverzite vírusov krytosemenných rastlín. Táto sa zdá byť úplne bez vírusov s veľkými alebo lineárnymi DNA genómami, zahŕňa však DNA vírusy s malými, kruhovými, jednovláknovými genómami: pararetrovírusy, ktoré enkapsidujú dvojvláknovú DNA

a exprimujú svoj genóm prostredníctvom RNA medziproduktu, a veľké množstvo vírusov majúcih RNA genóm, kam patria aj vírusy, ktorých virióny enkapsidujú pozitívne (+) alebo negatívne (-) orientované jednovláknové RNA (ssRNA), dvojvláknové RNA (dsRNA) alebo ambisense RNA (Kazazian, 2004; Goodier *et* Kazazian, 2008). Sekvenčná analýza podobnosti i fylogenetické štúdie preukázali hlboké a prastaré vzťahy každej z týchto vírusových skupín s vírusmi, ktoré môžu infikovať huby a živočíchy. Uvedené štúdie načrtli evolučné spojenie medzi týmito vírusovými líniami a vírusmi infikujúcimi jednobunkové eukaryotické organizmy, baktérie a archeóny (Koonin *et al.*, 2015).

3.4.1 Metagenomika a rastlinné vírusy

Termín metagenomika odkazuje na sekvenčnú analýzu vzoriek z prostredia obsahujúceho neznámu zmes foriem života, často veľa takých, ktoré nie sú kultivovateľné *in vitro*. V roku 2002 Breitbart *et al.* prvýkrát vykonali metagenomickú štúdiu morských vírusov shotgun sekvenovaním vzorky vírusovej populácie získanej z 200 litrov morskej vody. Rozvoj metagenomiky viedol k hlbšiemu poznaniu obrovskej rozmanitosti mikrobiálneho sveta. Pre mnoho mikroorganizmov sa osvedčilo sekvenovanie univerzálnych genómových oblastí, ako napríklad ribozomálnych RNA génov (Stackebrandt *et* Goebel, 1994; Seifert, 2009). Avšak vírusy neobsahujú žiadne všeobecne konzervatívne sekvencie, preto metagenomické vírusové štúdie využívajú takzvaný „enrichment“ vzoriek zo životného prostredia o vírusy nasledovaný random alebo shotgun sekvenáčnou analýzou. Nedávne metagenomické štúdie objavili vírusom podobné sekvencie z rôznych prostredí vrátane rastlín (Roossinck *et al.*, 2010). Spoločnou témou všetkých vírusových metagenomických štúdií je veľké množstvo vírusom podobných sekvencií vo všetkých prostrediach, a tiež veľmi vysoký počet sekvencií so žiadnym vzťahom ku známym sekvenciám v databázach. Nedostatkom väčšiny týchto štúdií je, že neumožňujú rozsiahle ekologické analýzy, pretože hostiteľa vírusu nie je možné určiť.

Rastlinní virológovia používajú k štúdiu biodiverzity niektoré prístupy líšiace sa od iných metagenomických štúdií. V niektorých prípadoch analyzujú zmesné vzorky (tiež označované ako „lawn mover method“), iné štúdie oddeľujú jednotlivé vzorky rastlín, čo umožňuje podrobnejšiu analýzu ekológie vírusov. Tieto typy štúdií sú označované ako ekogenomika, aby sa odlišili od tých, ktoré využívajú environmentálne vzorky (Roossinck, 2011).



Obrázok 1: Distribúcia vírusových druhov do čeladi. Číslo označujú počet druhov rastlinných vírusov v každej čeladi podľa Medzinárodného výboru pre taxonómiu vírusov (ICTV). Čelade s hviezdičkou zahŕňajú druhy infikujúce ďalších nerastlinných hostiteľov (Roossinck, 2012).

3.4.2 Detekcia rastlinných vírusov

Vírusy tvoria takmer polovicu (47 %) hlásených rastlinných infekčných chorôb (Anderson *et al.*, 2004). Detekcia a identifikácia existujúcich, vznikajúcich a nových vírusov sa spolieha na širokú škálu techník, ako napríklad biologické testy, elektrónová mikroskopia, polymerázová reťazová reakcia (PCR) a jej varianty, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a v poslednej dobe tiež microarraye (Mumford *et al.*, 2006; Boonham *et al.*, 2008). Biologické testy a elektrónová mikroskopia sú najstaršie techniky používané pre detekciu širokého spektra známych rastlinných vírusov v prípade identifikácie nových vírusov (Matthews, 1991). Biologické testy sú závislé od dostupnosti vhodných diferenciacnych a propagatívnych hostiteľských rastlín. Taktiež vyžadujú vhodné environmentálne podmienky a v niektorých prípadoch sa symptómy na kontrolných rastlinách môžu prejaviť až za niekoľko mesiacov. Okrem toho je interpretácia výsledkov testov subjektívna. Elektrónová mikroskopia poskytuje priamy dôkaz prítomnosti vírusu, ale je schopná rozlíšiť od seba iba vírusy s odlišnou morfológiou.

Vírusová diagnostika sa stala ľahko dostupnou, vďaka dvom hlavným prielomom v priebehu posledných štyroch desaťročí. Prvým z nich bol sérologický test ELISA vo forme, ktorá používa pre detekciu vírusov polyklonálne alebo monoklonálne protilátky. Polyklonálne protilátky sú väčšinou druhovo či kmeňovo špecifické, ale nemožno vylúčiť krížové reakcie (Clark *et Adams*, 1977). Druhým bola možnosť amplifikácie DNA *in vitro* všeobecne známa ako PCR (Candresse *et al.*, 1998).

Spomenuté techniky nie sú vhodné pre identifikáciu nových vírusov, pretože vyžadujú predchádzajúce znalosti o víruse, a to buď jeho sekvenčnú informáciu pre návrh primerov, alebo vírusovo špecifické protilátky. Vzhľadom na tieto obmedzenia boli pre lepšiu detekciu a charakterizáciu nových či neobvyklých vírusov napádajúcich rôzne rastliny použité nové prístupy, predovšetkým sekvenačné technológie novej generácie. Uvedené sekvenovanie bolo použité aj na objasnenie rastlinných ochorení neznámej vírusovej etiológie a interakcie hostiteľ – vírus. Prehľad pokrokov dosiahnutých využitím sekvenovania novej generácie pri charakterizácii, objave a molekulárnych interakciách rastlinných vírusov je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Využitie sekvenčných technológií novej generácie vo výskume rastlinných vírusov podľa Web of Science

Objav	Použitý prístup	Sekv. platforma	Referencia
<i>Nectarine stem pitting associated virus</i> (NSPaV)	Metagenomická analýza	Illumina	Bag <i>et al.</i> , 2015
Kompletná genómová sekv. HVEV vírusu	Sekvenovanie párových koncov	Illumina	Candresse <i>et al.</i> , 2016
<i>Botrytis ourmia-like virus</i>	Sekvenovanie cDNA	Illumina	Donaire <i>et al.</i> , 2016
Nový kmeň TSV vírusu	Sekvenovanie „poolovej“ cDNA	454-FLX	Dutta <i>et al.</i> , 2013
Korelácia medzi expresiou génu WRKY16 a príznakmi vírusu TCV	Sekvenovanie RNA	Illumina	Gao <i>et al.</i> , 2016
Potato mop-top virus (PMTV)	Sekvenovanie celkovej RNA	Illumina	Gil <i>et al.</i> , 2016

Tabuľka 1: Využitie sekvenčných technológií novej generácie vo výskume rastlinných vírusov podľa Web of Science – pokračovanie

Objav	Použitý prístup	Sekv. platforma	Referencia
Identifikácia satelitnej RNA GFRV vírusu vo viniči hroznorodom (<i>V. vinifera</i>)	Sekvenovanie smRNA	Illumina	Chiumenti <i>et al.</i> , 2016
<i>Gompholobium virus A</i>	Sekvenovanie dsRNA	Illumina	Koh <i>et al.</i> , 2016
<i>Squash chlorotic leaf spot virus</i>	Sekvenovanie smRNA	Illumina	Lecoq <i>et al.</i> , 2016
<i>Apple geminivirus</i>	Sekvenovanie smRNA	Illumina	Liang <i>et al.</i> , 2015
<i>Citrus chlorotic dwarf-associated virus</i>	Sekvenovanie smRNA a DNA	Illumina	Loconsole <i>et al.</i> , 2012
<i>Ramu stunt virus</i>	Sekvenovanie cDNA	Illumina	Mollov <i>et al.</i> , 2016
<i>Grapevine redleaf-associated virus</i>	Sekvenovanie cDNA	Illumina	Poojari <i>et al.</i> , 2013
<i>Tomato matilda virus</i>	Sekvenovanie cDNA	Illumina	Saqib <i>et al.</i> , 2015
<i>Citrullus lanatus cryptic virus</i>	Sekvenovanie RNA	SOLiD	Sela <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus tristeza virus</i>	Sekvenovanie siRNA	Ion Torrent	Varveri <i>et al.</i> , 2015
<i>Lettuce big-vein associated virus</i>	Sekvenovanie celkovej RNA	454 GS-FLX	Verbeek <i>et al.</i> , 2013
<i>Lettuce necrotic leaf curl virus</i>	Sekvenovanie cDNA	Illumina	Verbeek <i>et al.</i> , 2014
<i>Blueberry shoestring virus</i>	Sekvenovanie DNA	Ion Torrent	Yanagisawa <i>et al.</i> , 2016
<i>Apple stem grooving virus</i> = <i>Citrus tatter leaf virus</i>	Sekvenovanie RNA	Illumina	Yeonhwa <i>et al.</i> , 2016

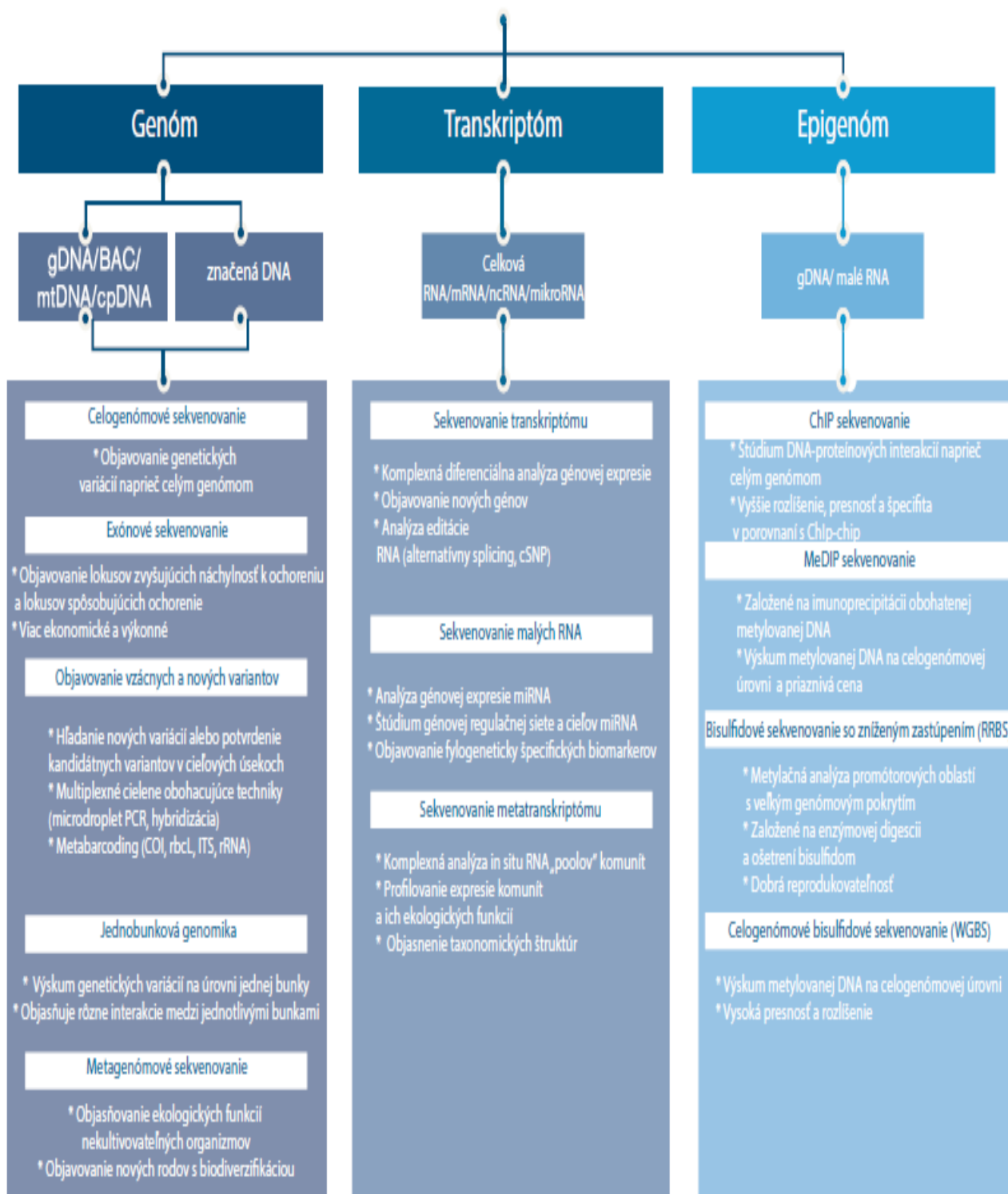
3.4.3 Sekvenačné technológie novej generácie (NGS)

Vysoko kapacitné NGS metódy sú základným nástrojom metagenomických stratégií pre identifikáciu neznámych chorôb spojených s vírusmi a objavovaním nových vírusov. Majú tiež nezastupiteľnú úlohu pri štúdiu mikrobiálnej evolúcie, mechanizmov patogenézy a fylogeografie, umožňujú priamu detekciu, identifikáciu a objavovanie vírusov objektívnym spôsobom bez nutnosti použitia protilátok alebo predchádzajúcej znalosti sekvencie patogénu. Tieto metódy však nemožno použiť na rutinnú diagnostiku vzhľadom na cenu analýzy a neoverenú reprodukovateľnosť (Cox-Foster *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2008; Barzon *et al.*, 2011; Studholme *et al.*, 2011).

Pyrosekvenačná platforma 454 FLX, vyvinutá firmou 454 Life Sciences v roku 2005, bola prvou sekvenačnou technológiou novej generácie. Sekvenátor spoločnosti Illumina vyvinutý firmou Solexa uviedli na trh začiatkom roka 2007. Platformy 454, Illumina a SOLiD (vyvinutá v roku 2006) sekvenujú populácie amplifikovaných templátových DNA molekúl s typickou technikou „wash-and-scan“ a predstavujú druhú generáciu NGS technológií (Schadt *et al.*, 2010).

V posledných piatich rokoch bolo vyvinutých mnoho ďalších vylepšených platforiem ako Heliscope, Ion Torrent, real-time sekvenovacie platformy PacBio RSII firmy Pacific Biosciences a ION firmy Oxford Nanopore. Ion Torrent a Heliscope sa nachádzajú na pomedzí technológií druhej a tretej generácie, pretože majú mnoho vlastností technológií druhej a niektoré z technológií tretej generácie, zatiaľ čo sekvenačné platformy firiem Pacific Biosciences a Oxford Nanopore sú označované ako sekvenačné metódy tretej generácie, pretože sekvenujú veľké molekuly DNA kontinuálne, bez nutnosti prerušenia medzi jednotlivými sekvenačnými krokmi („single molecule real time sequencing; SMRT“) (Prabha *et al.*, 2013). Možnosti aplikácií sekvenovania novej generácie zhrnuli Kim *et al.* v schéme, ktorú uvádzam v obrázku 2.

Sekvenovanie novej generácie



Obrázok 2: Možnosti sekvenovania novej generácie (Kim et al., 2014)

3.4.4 Aplikácie NGS technológií v rastlinnej virológii

NGS technológie urýchlili pokrok v detekcii vírusov pomocou metagenomickej analýzy a „deep sequencingu“. *De novo* sekvenácia vírusov pomocou metódy „deep sequencing“ je technikou, ktorá úspešne identifikovala známe i neznáme vírusy (Capobianchi *et al.*, 2013). Sekvenácia NGS metódami využíva nukleové kyseliny, pričom existuje niekoľko možností.

Prvou aj najstaršou je izolácia RNA z infikovaného hostiteľa, z ktorej sa reverznou transkripciou získa cDNA, z tej sa potom konštruujú sekvenačné knižnice a nasleduje vlastné NGS sekvenovanie. Týmto postupom bola analyzovaná celková RNA z rastlín rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum*) infikovaných vírusom mozaiky pepina (PepMV). Vyizolovaná nukleová kyselina (RNA) sa reverznou transkripciou previedla na cDNA a boli pripravené sekvenačné knižnice, ktoré boli následne sekvenované, čím sa získalo 65 691 sekvencií. Tieto sa nasledujúcim skladaním do kontigov zredukovali na 387 kontigov a 6 963 nepriradených sekvencií. Ďalšia analýza programom BLAST (Altschul *et al.*, 1997) ukázala, že 20,1 % z celkového počtu sekvencií patrilo PepMV a 70 % sekvencií bolo rastlinného ribozomálneho alebo chloroplastového pôvodu. Sedem zo zostavených kontigov zodpovedalo PepMV, pričom pokrývali 97 percent vírusového genómu. S použitím už publikovanej sekvencie PepMV (Acc. No. AJ606361) ako „scaffoldu“ a ďalších dosiaľ nepriradených sekvencií z kompletného datasetu bolo dosiahnuté 100 percentné pokrytie genómu. Získaná sekvencia mala dĺžku 6 382 bp, bez poly(A) konca (Adams *et al.*, 2009).

Ďalším prístupom je izolácia vírusovo špecifickej dsRNA a sekvenovanie tejto frakcie pomocou NGS. Týmto prístupom bola analyzovaná napríklad populácia rastlín viniča hroznorodého (*Vitis vinifera*). Dvojreťazcová RNA sa izolovala z „poolu“ materiálu získaného zo 44 náhodne vybraných rastlín pochádzajúcich z jedného vinohradu. Z dsRNA bola syntetizovaná cDNA. Fragментy cDNA s veľkosťou cca 200 bp boli vybrané pre PCR „enrichment“, na ktorý sa použila qPCR. Nasledovalo sekvenovanie metódou Illumina. Zo získaných sekvencií boli vytvorené kontigy, a z nich „scaffoldy“ s použitím *de novo* algoritmu programu Velvet (Zerbino *et Birney*, 2008). Výsledkom bolo 449 „scaffoldov“, ktoré boli analyzované s využitím programu BLAST. Analýza ukázala, že tieto „scaffoldy“ zodpovedajú vírusom *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) s 59 % z celkového počtu sekvencií; *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) s 4 %; *Grapevine virus A* (GVA) s 1 %; a *Grapevine virus E* (GVE) s 1 % (Coetzee *et al.*, 2010).

Inou možnosťou je izolácia malých RNA (smRNA). Štyri podozrivé vzorky rajčiaka pochádzajúce z USA a Mexika boli použité pre tvorbu smRNA knižnice a „deep sequencing“. Z každej knižnice bolo získaných medzi 5 – 7 miliónmi smRNA sekvencií, z ktorých viac ako 90 % bolo z genómu rajčiaka. Po *in silico* odpočítaní rajčiakových smRNA boli ostávajúce vírusom podobné siRNA zostavené s/bez využitia referenčného vírusu. Kompletný genóm sa zostavil pre *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) len s využitím siRNA. Okrem toho, bol zostavený takmer kompletný genóm (98 %) vírusu *Pepino mosaic virus*. S využitím *de novo* zostavovania sekvencií bol identifikovaný nový potyvírus s menej ako 60 % celkovej genómovej nukleotidovej sekvenčnej identity s inými známymi vírusmi a získala sa úplná genómová sekvencia tohto vírusu (Li *et al.*, 2012).

Skladanie významnej časti vírusovej sekvencie z prekryvov malých interferujúcich RNA (siRNA) pre identifikáciu vírusu je ďalším úspešným prístupom využívajúcim masívne paralelné sekvenovanie. Tento prístup sa aplikoval napríklad pre charakterizáciu kompletného virómu povojníku batátového (*Ipomoea batatas*). Z rastlín infikovaných dvoma RNA vírusmi *Sweetpotato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweetpotato chlorotic stunt virus* (SPCSV) buď individuálne alebo simultánne sa vyizolovala celková RNA, ktorá bola následne prepísaná do cDNA a skonštruované sekvenačné knižnice boli sekvenované metódou Illumina. Kontigy siRNA boli zostavené s pomocou troch rôznych softvérov na zostavovanie malých sekvencií: Velvet, SSAKE (Warren *et al.*, 2007) a VCAKE (Jeck *et al.*, 2007).

Výsledkom boli rôzne sa prekrývajúce kontigy v závislosti od použitého programu a nastavených parametrov, tieto sa mohli ďalej skladať do väčších kontigov pomocou programu Contig Express, ktorý je súčasťou softvérového balíka Vector NTI® (<https://www.thermofisher.com/sk/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software/vector-nti-advance-downloads.html>). Takto zostavené kontigy boli použité na vyhľadávanie v databázach GenBank/EMBL/DDBJ pomocou BLAST-u. Prehľadávanie nukleotidových a proteínových databáz BLAST-om so zostavenými kontigmami a im zodpovedajúcimi peptidami úspešne identifikovalo očakávané vírusy v každej rastline a prekvapivo tiež niekoľko kontigov podobných s badnavírusmi (čel'ad' *Caulimoviridae*; dsDNA reverzne sa transkribujúce vírusy) a mastrevírusmi (čel'ad' *Geminiviridae*; ssDNA vírusy). Okrem toho pokrývali kontigy SPFMV generované zo simultánne infikovaných rastlín celý genóm a mohli byť ďalej zostavené pre vytvorenie kompletnej genómovej sekvencie tohto vírusu (Kreuze *et al.*, 2009).

Metagenomická analýza vektora (Vector-enabled metagenomics; VEM) s využitím NGS je ďalším praktickým prístupom štúdia rozmanitosti vírusov, konkrétne tých, ktoré sú prenášané cez vektorov. Tento prístup umožnil popis DNA vírusov molíc tabakových (*Bemisia tabaci*) zozbieraných z dvoch dôležitých poľnohospodárskych oblastí – Homestead a Citra na Floride. Zozbierané molice boli homogenizované, vírusy boli prečistené filtráciou cez Sterivex filter (Millipore, Billerica, MA), následne extrahované a osekvenované. Tým sa získali DNA sekvencie vírusov prítomných v moliciach. BLAST analýza ukázala, že 79 % zo sekvencií virómu molíc z oblasti Citra a 93 % sekvencií z oblasti Homestead vykazovalo významnú podobnosť so známymi begomovírusmi s identitou medzi 70 až 100 %. Virómu molíc z oblasti Citra dominoval *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV), ide o begomovírus známy tým, že napáda rastliny dyne červenej (*Citrullus lanatus*). Usporiadanie („alignment“) získaných sekvencií voči referenčnému genómu CuLCrV z databázy GenBank preukázalo, že VEM analýza takmer úplne pokryla DNA-A a čiastočne pokryla DNA-B sekvenciu tohto vírusu. Segmenty oboch DNA-A a DNA-B zložené z daného virómu zdieľali 97 % nukleotidovú identitu s referenčným genómom CuLCrV. Dve sekvencie s homológiou 96 – 97 % boli identifikované ako DNA-B vírusu *Sida golden mosaic virus* a jedna sekvencia identifikovala *Tobacco leaf rugose virus* s identitou 88 %. Obdobne boli pri viróme molíc z Homesteadu objavené vírusy *Anoda geminivirus*, *Macrotidium golden mosaic virus*, *Malvastrum yellow mosaic Helshire virus*, *Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus*, *Sida golden mosaic virus*, *Sida golden yellow vein virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Wissadula golden mosaic virus*, s dominanciou *Tomato yellow leaf curl virus* a *Sida golden mosaic virus* (Ng *et al.*, 2011).

Metódou „deep sequencing“ bol identifikovaný nový zástupca rodu *Cucumovirus*. Vzorka RNA pochádzala z gomfrény hlávkatej (*Gomphrena globosa*) infikovanej neznámym patogénom pôvodne izolovaným mechanickou inokuláciou z kvitnúcej liatry klasnatej (*Liatris spicata*). RNA z tejto vzorky bola sekvenovaná, získalo sa 71 146 sekvencií a z nich vzniklo 738 kontigov. BLAST analýza ukázala, že 40,9 % sekvencií bolo vzdialene príbuzných s cucumovírusmi *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Peanut stunt virus* (PSV) a *Tomato aspermy virus* (TAV), približne 47 % sekvencií malo ribozomálny alebo chloroplastový pôvod. Genóm nového cucumovírusu s navrhovaným názvom *Gayfeather mild mottle virus* infikujúceho liatru klasnatú, nevyžadoval dodatočné skladanie s pomocou referenčných genómov a bol kompletne zložený zo získaných kontigov (Adams *et al.*, 2009).

Analýza malých RNA sekvencií z listov divoko rastúcej reznáčky laločnatej (*Dactylis glomerata*) s použitím 454 „deep sequencingu“ objavila doteraz nepoznaný vírus žltej zakrslosti obilnín (CYDV) patriaci do čeľade *Luteoviridae*, rodu *Luteovirus* (Pallett *et al.*, 2010).

3.4.4.1 Ekogenomika vírusov a charakterizácia vírusovej populácie alebo virómu rastlín

NGS technológie urýchlili pokrok v detekcii vírusov pomocou metagenomického sekvenovania, ktoré dalo možnosť rozvoju metagenomiky umožňujúcej presné stanovenie vírusovej populácie v danom ekosystéme alebo konkrétnom organizme, čo je známe pod pojmom viróm. Uskutočnila sa metagenomická štúdia biodiverzity vírusov získaných z rastlinného materiálu pochádzajúceho z prírodnej rezervácie Tall Grass Prairie Preserve v severovýchodnej Oklahome, ide o oblasť s relatívne nízkou diverzitou rastlín, a Area de Conservacion Guanacaste v severozápadnej Kostarike, ktorá je naopak oblasťou s mimoriadne vysokou rozmanitosťou rastlinných druhov. Obohatená dsRNA z rastlinných vzoriek sa reverznou transkripciou prepísala do cDNA. Táto bola namnožená pomocou PCR a zo vzoriek sa následne vytvorili „pooly“, ktoré boli osekvenované metódou 454. Sekvencie sa postupne skladali softvérom Newbler s výsledkom 4 200 kontigov s priemernou dĺžkou 400 bp. Tie sa ďalej zanalyzovali BLAST-om, čo preukázalo infekcie vírusmi čeľadi *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Chrysoviridae*, *Closteroviridae*, *Endornaviridae*, *Luteoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae*, *Potyviridae*, *Totiviridae*, *Tymoviridae* a niektorými neznámymi vírusmi (Roossinck *et al.*, 2010).

S pomocou sekvenovania celkovej RNA bola vykonaná štúdia zaoberajúca sa detekciou vírusov z listového pletiva mučenky belasej (*Passiflora caerulea*) vykazujúcej príznaky vírusovej infekcie. Vyizolovaná RNA sa reverzne transkribovala do cDNA, ktorá bola následne sekvenovaná metódou Illumina. Päť miliónov sekvencií náhodne vybraných z datasetu sa skladalo programom Geneious Pro 5.0 (Drummond *et al.*, 2010). Priemerný počet kontigov na milión sekvencií bol 10 675. BLAST analýza odhalila, že najdlhší kontig mal 99,2 % identitu s *Passionfruit woodiness virus*, ktorého celogenómová sekvencia bola úspešne zostavená zo získaných kontigov. Okrem toho boli úspešne osekvenované polyadenylované aj nepolyadenylované vírusy, vrátane DNA vírusov. Sekvenovali sa celkové RNA extrahované zo 120 listových vzoriek pochádzajúcich zo 17 druhov rastlín, pričom 12 z identifikovaných vírusov patrilo do už popísaných rodov *Potyvirus*, *Nepovirus*,

Allexivirus a *Carlavirus*, ale 4 boli celkom neznáme, a preto sú navrhované za nových členov rodov *Potyvirus*, *Sadwavirus* a *Trichovirus* (Wylie *et al.*, 2011).

Polyadenylovaná RNA z rastliny západoaustrálskej endemickej strukoviny *Hardenbergia comptoniana* a z rastliny prirodzene sa vyskytujúcej mučenky belasej bola sekvenovaná s použitím technológie Illumina. *De novo* skladanie softvérom Velvet a Geneious Pro a následná BLAST analýza kontigov odhalili kompletne genómové sekvencie 2 rôznych izolátov vírusu *Hardenbergia mosaic virus* (HarMV), izolátu *Passionfruit woodiness virus* a nepopísaných vírusov patriacich do čeľade *Betaflexiviridae* (Wylie *et al.*, 2012c).

Metóda „deep sequencing“ bola použitá na charakterizáciu rastlinných vírusových infekcií viniča hroznorodého z Talianska, Južnej Afriky a USA (Al Rwahnih *et al.*, 2009; Coetzee *et al.*, 2010; Al Rwahnih *et al.*, 2011; Giampetruzzia *et al.*, 2011). Z dsRNA izolovanej z jednotlivých rastlín alebo zo zmesného tkaniva z jednotlivých viníc (Al Rwahnih *et al.*, 2009; Coetzee *et al.*, 2010) boli objavené 2 nové DNA vírusy, ktoré patria do rodov *Badnavirus* a *Mastrevirus*.

„Deep sequencing“ analýza RNA z rastlín viniča, ktoré vykazovali príznaky ochorenia Syrah decline s využitím 454 vysokokapacitného sekvenovania odhalila niekoľko vírusov a viroidnú infekciu. Vo viniči pochádzajúceho z USA bol objavený nový vírus pomenovaný *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) (Al Rwahnih *et al.*, 2009). NGS sekvenovanie dsRNA zmesných vzoriek zo 44 rastlín viniča odhalilo množstvo vírusov a aj domnelé hubové vírusy (Coetzee *et al.*, 2010). Charakterizácia virómu jednotlivých rastlín 454 vysokokapacitným sekvenovaním dsRNA získanej z kmeňa viniča ukázala, že mu dominovali práve mykovírusy. Analýza preukázala kľúčovú sadu sekvencií podobných sekvenciám hubových vírusov reprezentujúcu polovicu všetkých známych čeľadí mykovírusov vrátane *Chrysoviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae* a *Totiviridae* (Al Rwahnih *et al.*, 2011).

Analýza malých RNA z 2 rastlín viniča odrody Pinot-Gris v talianskej oblasti Trentino bola vykonaná pomocou Illumina vysokokapacitného sekvenovania. Štúdia odhalila vírusy a viroidy u oboch rastlín, ktorých viróm pozostával z *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV), GSyV-1, doteraz neznámeho vírusu a 2 viroidov *Hop stunt viroid* (HSVd) a *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd1). Uvedená analýza viedla tiež k objavu nového vírusového druhu. Nový vírus mal genómovú organizáciu zhodnú s *Grapevine inner berry virus* (GINV), čo je

trichovírus hlásený iba z Japonska, ale molekulárne rozdiely s GINV boli dostatočne veľké na to, aby bolo možné objavený vírus klasifikovať ako nový druh, pre ktorý bol navrhnutý provizórny názov *Grapevine Pinot gris virus* (Giampetruzzia *et al.*, 2011).

3.5 Globálny viróm

Globálny viróm zahŕňa všetky vírusy infikujúce rôzne formy života, alebo jednoducho všetky vírusy existujúce v prírode. Zatiaľ čo niektoré vírusy sú obmedzené iba na určitého hostiteľa, iné môžu nakaziť viacero druhov. To znamená, že viróm určitého druhu by mal zahŕňať iba tie vírusy, ktoré osídľujú a najčastejšie napádajú daného hostiteľa (druh). Viróm hostiteľa zahŕňa však tiež endogénne vírusy a vírusom podobné častice ako aj vírusy, ktoré infikujú mikroorganizmy osídľujúce hostiteľa (Virgin, 2014).

Vývoj vysoko výkonných sekvenovacích platforiem novej generácie viedol k dramatickému zníženiu nákladov a nárastu objektívne objavených nových vírusových sekvencií (Lipkin, 2013). Niektoré z týchto nových vírusov sú tak výrazne odlišné od dosiaľ známych vírusov, že môžu byť klasifikované len ako prvé členy nových vírusových čeladi (Kapoor *et al.*, 2010). Hoci tieto pokroky teoreticky sľubujú kompletnú genetickú charakterizáciu globálneho virómu, na identifikáciu vírusov veľmi odlišných od akýchkoľvek dosiaľ známych patogénov je potrebné ďalšie zdokonalovanie dostupných technológií, či už z hľadiska softvérového alebo hardvérového (Anthony *et al.*, 2013; Delwart, 2013).

Zameraním väčšiny vírusových objavných štúdií bola identifikácia a charakterizácia ľudských vírusov, kvôli ich klinickému a verejnozdravotníckemu významu (Wylie *et al.*, 2012a). Komplexné štúdium globálneho virómu odhalí pravdepodobne nepreberné množstvo homológov ľudských vírusov, a tým povedie k lepšiemu pochopeniu vzniku ľudských vírusov a potenciálnych ochorení ľudí a zvierat (Anthony *et al.*, 2013). Znalosť týchto faktov umožní okrem toho rýchlu identifikáciu prírodných rezervoárov novo vznikajúcich ľudských patogénov a vývoj prostriedkov na zabránenie budúcemu medzidruhovému prenosu vírusov.

4. Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Listy bazy čiernej (*Sambucus nigra* L.) s označením B2 pochádzajúcej z Olomouca – Hněvotínu, odobraté 13. septembra 2015 pracovníkmi Laboratoře molekulární biologie mikroorganizmů Katedry buněčné biologie a genetiky UP v Olomouci, uchovávané pri teplote -80°C.

4.2 NGS sekvenovanie

4.2.1 Izolácia dsRNA

Izolácia dsRNA zo vzorky bazy čiernej s označením B2 prebiehala podľa tohto postupu: 10 g listov bazy čiernej bolo homogenizovaných v tekutom dusíku a extrahovaných zmesou 13,3 ml STE (2x); 930 µl SDS (20 %); 270 µl bentonitu (40 mg/ml) a 19 ml fenolu-TE (pH 8,0). Zmes bola následne dôkladne premiešaná a umiestnená do rotátora na dobu 60 minút pri teplote 4°C. Následovala centrifugácia pri 3 000 g po dobu 15 minút pri teplote 20°C. Vodná fáza bola prepipetovaná do skúmaviek a centrifugovaná pri 10 000 g (20 minút, 20°C). K zozbieranej vodnej fáze boli pridané 3 ml 100 % etylalkoholu (Lachner) a obsah skúmavky bol dôkladne premiešaný. Potom bola zmes prepipetovaná po 10 ml do skúmaviek obsahujúcich 200 mg celulózy CF11 (Whatman) a umiestnená do rotátora na 60 minút pri teplote 4°C. Suspenzia bola premytá 1 ml STE (1x) + 15 % etylalkoholom a premiešaná, nasledovalo pomalé miešanie po dobu 5 minút, centrifugácia pri 5 000 g (1 minúta, 20°C) a odobratie supernatantu, tento krok bol zopakovaný dvakrát. K suchej celulóze CF11 bolo pridaných 200 µl STE (1x), obsah skúmavky bol dôkladne premiešaný na rotátore (5 minút, 20 °C). Následovala centrifugácia pri 5 000 g (1 minúta, 20°C). Supernatant bol odobratý do novej skúmavky a bola zopakovaná elúcia naviazaných nukleových kyselín z CF11 celulózy. K zachytenému supernatantu bolo pridaných 40 µl 3M octanu sodného (pH 5,2) a 320 µl izopropanolu. Nukleové kyseliny boli precipitované cez noc pri -80°C. Na druhý deň boli centrifugované pri 20 000 g (20 minút, 20°C), premyté 0,5 ml 75 % etylalkoholom a znovu centrifugované za rovnakých podmienok. Sediment bol vysušený na SpeedVacu (ThermoFisher), nato bol rozpustený v 170 µl DEPC vody a ošetrený DNázou I podľa návodu výrobcu. Nasledne bol extrahovaný 300 µl fenol:chloroform:izoamylalkoholom (25:25:1) a centrifugovaný pri 10 000 g (5 minút, 20°C); dsRNA bola vo vodnej fáze zrážaná 2 objemami 100 % etylalkoholu a 1/10 objemu 3M octanu sodného. Zrážaná dsRNA bola uchovávaná jednu hodinu v mrazáku pri -80°C a potom centrifugovaná pri 20 000 g

(20 minút, 4°C). Supernatant bol odobraný a pelet premytý 500 µl 70 % etylalkoholu a centrifugovaný pri 20 000 g (20 minút, 4°C). Supernatant bol znovu odobratý a pelet vysušený na SpeedVacu. Následne bol pelet rozpustený v 50 µl DEPC vody a uchovávaný pri -80°C.

V takto pripravenej vzorke bazy čiernej s označením B2 boli stanovené hodnoty koncentrácie a kvality vyizolovanej RNA pomocou Agilent RNA 6 000 Nano kitu s výsledkom 817 ng/µl a RIN (RNA Integrity Number) 3,5.

4.2.2 Vlastné sekvenovanie

dsRNA izolovaná zo vzorky bazy čiernej bola sekvenovaná metódou Illumina s využitím sekvenátoru HiSeq2500, firmou SEQme s.r.o. so sídlom v Dobříši.

4.2.3 Analýza sekvencií

Získané sekvencie boli analyzované s použitím programu Geneious 9.1.8 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Identita získaných sekvencií bola zistená pomocou implementovaného programu BLAST. Alignment analyzovaných sekvencií bol vykonaný programom ClustalW implementovanom v programe Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016). Sekvenčná matica bola následne použitá na analýzu genetickej variability. Fylogenetické vzťahy boli vyhodnotené pomocou Neighbour-joining analýzy v programe Mega 7, metódou Bootstrap s opakovaním 1000 x. Získaný fylogenetický strom bol vizualizovaný pomocou modulu TreeExplorer v programe Mega 7.

5. Použité přístroje, roztoky a chemikálie

5.1 Použité přístroje

Centrifúga Jouan MR 22i (Jouan)

Centrifúga K23D (VEB *MLW*)

Centrifúga Biofuge pico (Heraeus)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Minicentrifúga E-Centrifuge (Wealtec)

Minirotátor Bio RS-24 (Biosan)

Thermo Savant DNA SpeedVac® SPD111V (Thermo Scientific)

Váhy KERN 440-33N(KERN & SOHN GmbH – Waagen)

Vortex MS1 Minishaker IKA (Profilab)

5.2 Použité roztoky a chemikálie

bentonit (Sigma B3378)

celulóza CF11 (Whatman)

DEPC voda

DNáza I (Thermo Scientific EN0525)

etylalkohol (99,8 %) (Lachner)

etylalkohol (70 %)

fenol-TE (Sigma 77607)

fenol:chloroform: izoamylalkohol mix (Sigma P2069)

Izopropanol (Lachner)

SDS (20 %)

STE pufoř 2 x (0,2 M NaCl, 100 mM Tris, 2 mM EDTA)

octan sodný (3M, pH 5,2)

6. Výsledky

6.1 NGS sekvenovanie

V praktickej časti tejto diplomovej práce boli pomocou programu Geneious 9.1.8 zložené vírusové sekvencie získané sekvenovaním dsRNA pochádzajúcej zo vzorky bazy čiernej s označením B2, pre ktorú bolo metódou Illumina získaných 19 252 481 sekvencií. dsRNA sekvenačné knižnice boli pripravené s využitím TrueSeq Stranded mRNAseq Sample Prep kitu (Illumina) a sekvenované platformou HiSeq2500 s dĺžkou čítania 100 bp. Tieto boli následne zložené algoritmom Tadpole integrovaným v programe Geneious 9.1.8 do 4 519 *de novo* kontigov s minimálnou dĺžkou 200 bp, maximálnou dĺžkou 3 084 bp a priemernou dĺžkou 340 bp, s využitím 100 % objemu dát, hodnotou Kmer 19, bez orezávania pred skladaním, s minimálnym pokrytím 1 a minimálnym predĺžením 1. Následne bola vykonaná selekcia *de novo* kontigov na základe namapovania na známe sekvencie vírusov v databáze NCBI programom BLASTn s maximálnou e-value $1e-1$; match/mismatch score 2,-3 a minimálnou dĺžkou zhody sekvencií (word size) 11, čím bola zistená zhoda so sekvenciami vírusov *Elderberry carlavirus A* (EIVA) a *Elderberry carlavirus B* (EIVB). Týmto bolo získaných 11 kontigov, ktoré boli následne predlžované namapovaním kompletného balíka získaných sekvencií s využitím integrovaného mapperu Geneious pri v minimálnom prekryve sekvencií 80 % a minimálnej identite prekryvu 95 %. Predlžované kontigy boli potom blastované proti lokálne vytvorenej databázi obsahujúcej sekvencie *Elderberry carlavirus A* a *Elderberry carlavirus B*, za podmienok BLAST-u zhodných s podmienkami uvedenými vyššie, pre overenie správnosti a vylúčenie skladania artefaktov. Prehľad kontigov uvádzam v tabuľke 2.

Uvedené kontigy boli následne spájané v programe Mega 7 na základe vzájomného presahu dlhého minimálne 100 bp pri úplnej zhode prekrývajúcich sa úsekov do „scaffoldov“, ktorých bolo získaných 5 (prehľadne uvádzam v tabuľke 3). „Scaffoldy“ boli taktiež predlžované namapovaním kompletného balíka získaných sekvencií pri minimálnom prekryve sekvencií 80 % a minimálnej identite prekryvu 95 %, spájané a namapované na referenčné sekvencie *Elderberry carlavirus A* (Acc. No. KJ572560.2) a *Elderberry carlavirus B* (Acc. No. KJ572561.2) s využitím integrovaného mapperu Geneious.

Celkovo boli získané 3 vírusové sekvencie, z toho: 2 sekvencie *Elderberry carlavirus A*, a to: sekvencia A1 s celkovou dĺžkou 8 634 bp; pokrytím 97 % a identitou 81 % so sekvenciou EIVA (Acc. No. KJ572560.2); a sekvencia A2 s celkovou dĺžkou 8 626 bp;

pokrytím 74 % a identitou 76 % so sekvenciou EIVA (Acc. No. KJ572560.2) a 1 sekvencia *Elderberry carlavirus B* s celkovou dĺžkou 8 595 bp; s pokrytím 92 % a identitou 76 % so sekvenciou EIVB (Acc. No. KJ572561.2).

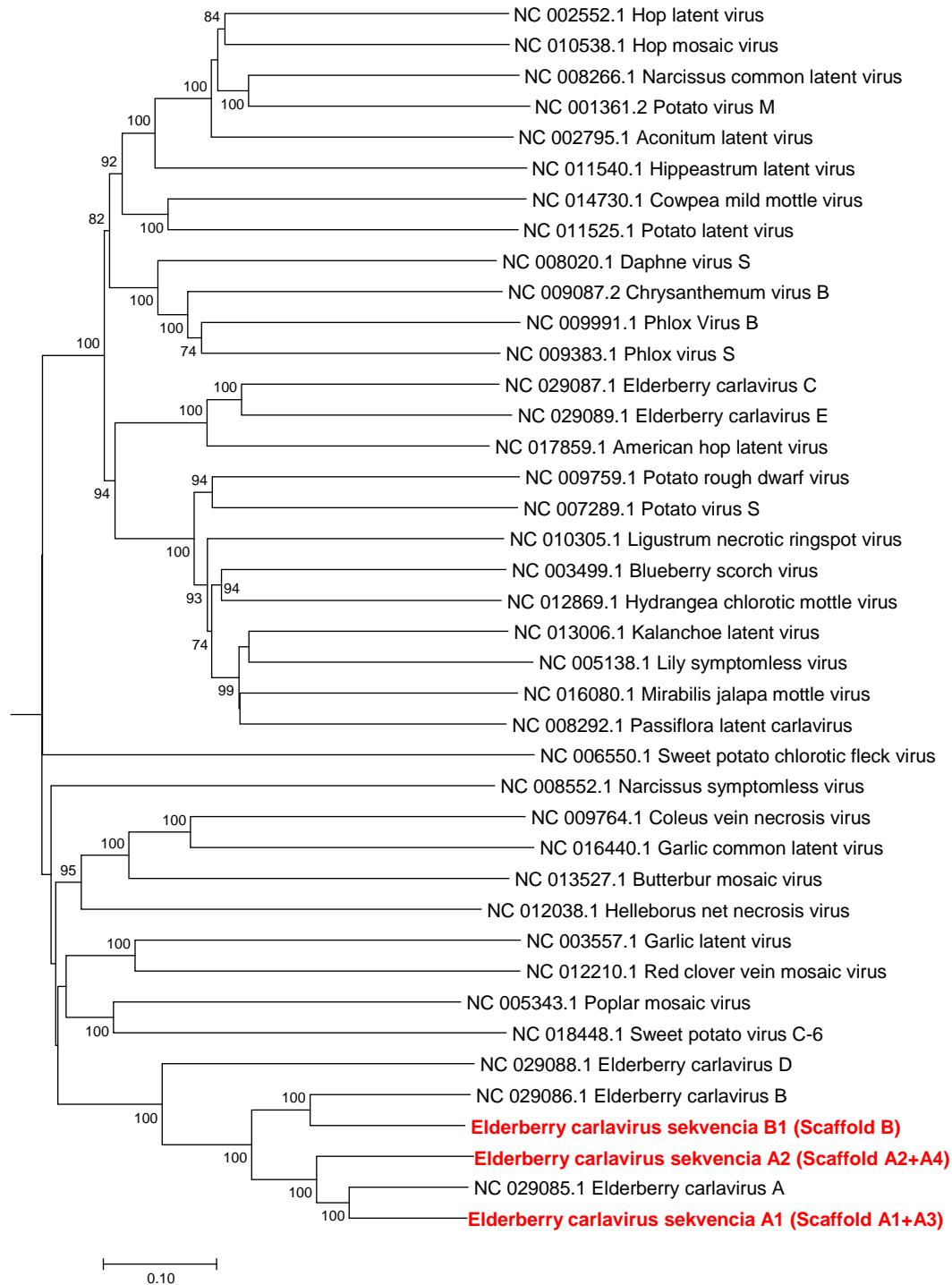
Tabuľka 2: Prehľad získaných kontigov

Kontig	Dĺžka (bp)	Priemerné pokrytie	Identita (%)
<i>Kontig 111</i>	1 155	1 958	99,4
<i>Kontig 1120</i>	432	1 989	99,5
<i>Kontig 1254 B</i>	553	7 022	99,5
<i>Kontig 1264</i>	447	2 268	99,5
<i>Kontig 165</i>	991	2 149	99,4
<i>Kontig 1654 B</i>	427	2 637	99,5
<i>Kontig 2321</i>	480	1 056	99,5
<i>Kontig 2535</i>	461	1 016	99,5
<i>Kontig 2711</i>	467	1 773	99,3
<i>Kontig 2716</i>	465	866	99,4
<i>Kontig 2741</i>	475	1 851	99,4

Tabuľka 3: Prehľad získaných „scaffoldov“

Scaffold	Dĺžka (bp)	Priemerné pokrytie	Identita (%)
Scaffold B	8 595	8 931	99,5
Scaffold A1	4 100	2 311	99,4
Scaffold A2	4 886	1 115	99,6
Scaffold A3	4 633	2 519	99,4
Scaffold A4	3 836	1 220	99,4

Fylogenetická analýza získaných sekvencií, ktorá bola uskutočnená v programe Mega 7 s využitím súboru sekvencií rastlinných vírusov patriacich do čeľade *Betaflexiviridae* jasne ukázala príslušnosť našich izolátov k vyššie spomínaným vírusom. Po zoradení celogenómových sekvencií bol metódou Neighbour-joining s bootstrap opakovaním 1 000 krát bol skonštruovaný fylogenetický strom (obrázok 3). Odlišnosť izolátu vzniknutého spojením „scaffoldov“ A3 a A4 bola daná výskytom rôznych alelových variant – SNP.



Obrázok 3: *Fylogenetický strom vybraných vírusových izolátov čelade Betaflexiviridae a našich zložených sekvencií zostavený metódou Neighbour-joining s bootstrap opakovaním 1 000 x. V obrázku sú značené iba bootstrap hodnoty presahujúce 70 percent a naše izoláty sú značené červenou farbou, mierka reprezentuje 0,1 substitúcií na pozíciu, sekvencie sú popísané identifikačným číslom (Accession Number) a názvom vírusu*

Analýza otvorených čítajúcich rámcov (ORF) v programe Mega 7 ukázala, že naše zložené vírusové sekvencie obsahujú všetkých 6 ORF špecifických pre karlavírusy, pričom naše sekvencie EICVA obsahujú kompletný ORF1 s dĺžkou 5 988 bp; sekvencia EICVB obsahuje takmer kompletný ORF 1 s dĺžkou 5 974 bp. Pre prehľadnosť uvádzam ich bližšie charakteristiky v tabuľke 4. Taktiež bol vykonaný výpočet počtu aminokyselinových zámien v zložených sekvenciách v porovnaní s referenčnými sekvenciami využitím pairwise distances analýzy s metódou p-distance, výsledky ktorej uvádzam v tabuľke 5.

Tabuľka 4: Prehľad otvorených čítajúcich rámcov v našich sekvenciách

Otvorený čítajúci rámec	Kóduje	Pozícia v našich sekvenciách (bp) A1; A2 / B1
<i>ORF 1</i>	Replikázový polyproteín	51-6 039/55-6 029
<i>ORF 2</i>	Triple gene block proteín 1	6 078-6 776/6 060-6 767
<i>ORF 3</i>	Triple gene block proteín 2	6 754-7 086/6 376-7 068
<i>ORF 4</i>	Triple gene block proteín 3	7 064-7 283/7 041-7 259
<i>ORF 5</i>	Plášťový proteín	7 339-8 235/7 317-8 210
<i>ORF 6</i>	Väzobný proteín NK	8 231-8 533/ 8 210-8 512

Tabuľka 5: Prehľad nukleotidových/aminokyselinových zámien v zložených sekvenciách v porovnaní s referenčnými sekvenciami uvádzaný percentách

Otvorený čítajúci rámec	Elderberry carlavirus A sekvencia A1	Elderberry carlavirus A sekvencia A2	Elderberry carlavirus B, sekvencia B1
<i>ORF 1</i>	21,4/11,4	26,5/16,4	27,7/18,7
<i>ORF 2</i>	20,6/13,8	25,5/20,7	27,0/16,7
<i>ORF 3</i>	23,4/19,1	27,0/19,1	23,1/16,4
<i>ORF 4</i>	24,2/25,0	33,8/36,1	25,6/30,6
<i>ORF 5</i>	17,9/2,3	21,0/4,7	20,4/5,7
<i>ORF 6</i>	18,5/21,7	27,7/36,0	16,8/15,0

Ďalej bolo zistené, že nukleotidová/aminokyselinová identita sekvencie A1 so sekvenciou B1 je 64,9 % / 45,2 % pre replikázový proteín a 75,7 % / 90,5 % pre plášťový proteín. Nukleotidová/aminokyselinová identita sekvencie A2 so sekvenciou B1 je 65,4 % / 44,7 % pre replikázový proteín a 76,6 % / 89,9 % pre plášťový proteín. Z čoho vyplýva, že sa jedná o 2 rozne vírusy - *Elderberry carlavirus A* a *Elderberry carlavirus B* (vid' obrázok 3; tabuľka 5). Charakteristický motív domény RNA-dependentnej RNA polymerázy (RdRp) karlavírusov S/TGG_{x3}TX₃NS/TX₂₂GDD bol identifikovaný v sekvenciách A1 a A2 a ich referenčnej sekvencií v pozícií 1 857-1 892 bp a mal sekvenciu SG_{x3}TX₃NTX₂₂GDD. V sekvencií B1 a jej referenčnej sekvencii bol identifikovaný v pozícií 1 848-1 883 bp a mal sekvenciu SG_{x3}TX₃NTX₂₃GDD.

7. Diskusia

V tejto práci boli skúmané vírusy bazy čiernej. Ide o 2 až 8 metrov vysoký ker z čeľade bazovité (*Sambucaceae*) rastúci hojne na celom území Českej republiky, rozšírený po celej Európe, Malej Ázii, na Kaukaze, západnej Sibíri, v severnej Afrike a severnej Amerike. Baza je značne odolná voči mrazu a darí sa jej v polotieni, na lesných čistinkách alebo okrajoch ciest, najmä v lužných a iných listnatých lesoch, hojne sa vyskytuje od nížin po horské pásmo, podobným spôsobom aj na druhotných stanovištiach pri plotoch, na opustených miestach, rumoviskách, pri domoch, na rúbaniskách. Rastie na čerstvých, humózných a kyprých, pôdach bohatých na živiny a dusík. (<http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=577>; navštívené dňa 3. 4. 2017).

Baza v súčasnosti získava popularitu na trhu ako čerstvé ovocie či prísada na varenie, ale taktiež v medicíne a priemysle (Grbic *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2012). Znalosť virómu bazy umožní predchádzať ochoreniam, ktoré znižujú výnosy tejto hospodársky významnej rastliny. V minulosti sa vírusy infikujúce bazu rozlišovali podľa miesta výskytu na severoamerické alebo európske, pričom jeden druh mohol byť popísaný pod rôznymi názvami (Ellis *et al.*, 1992). V súčasnosti sa preferuje klasifikácia na základe molekulárnych dát (Ho *et al.*, 2016). Je známe, že niektoré vírusy spôsobujú ochorenia v americkej aj európskej populácii bazy (Way, 1981), vrátane členov čeľadí *Bromoviridae* [*Cucumber mosaic virus* (Polák *et al.*, 1990)], *Secoviridae* [*Arabis mosaic virus*, *Cherry leaf roll virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Tobacco ringspot virus*, *Tomato black ringspot virus* (Lister, 1964; Uyemoto, 1970; Jones *et Murrant*, 1971; Jones, 1972; Way, 1981; Polák *et al.*, 1990)] a *Tombusviridae* [*Elderberry latent virus*, *Tobacco necrosis virus*, *Tomato bushy stunt virus* (Jones, 1972; Polák *et al.*, 1990; Uyemoto *et Gilmer*, 1971)]. *Blueberry scorch virus* (BIScV), *Elderberry symptomless virus* (EIBSV) a niekoľko ďalších predpokladaných členov rodu *Carlavirus* bolo taktiež diagnostikovaných v baze čiernej. (Van Lent *et al.*, 1980; Ellis *et al.*, 1992; Cooper, 1993). BIScV bol charakterizovaný na molekulárnej úrovni (Cavileer *et al.*, 1994), ale o iných karlavírusoch bazy vieme len veľmi málo. Táto skutočnosť robí z diskriminácie rôznych karlavírusov bazy náročnú úlohu.

Zmiešané infekcie neumožňujú posúdenie patogénneho vplyvu jednotlivých vírusov na bazu. Niektoré karlavírusy ako napríklad BIScV môžu spôsobiť závažné ochorenie u niekoľkých hostiteľov (Martin *et al.*, 2012), ale pri baze sú asymptomatické (Kalinowska *et al.*, 2013). Vzhľadom na to, že účinok nových vírusov v samostatnej alebo zmiešanej infekcii nie je známy a ich biologická charakterizácia postupne pokračuje (Postman

et al., nepublikované), malo by sa úsilie zamerať na odstránenie týchto vírusov z rastlín používaných v pestovateľských škôlkach. Kvôli rozmanitosti vírusov infikujúcich bazu a nedostatku informácií o ich vektoroch, je nutné pri výsadbe použiť testované certifikované rastliny bez vírusov (Charlebois *et al.*, 2010). V prípade iných bobuľovín, ako sú jahody a *Rubus spp.*, je dobre zdokumentované, že bezpríznakové vírusy môžu pôsobiť synergicky a spôsobovať závažné ochorenie, ak sa vyskytujú v zmesných infekciách (Martin *et Tzanetakis*, 2013; Martin *et al.*, 2013). V nami získaných vírusových sekvenciách, pochádzajúcich z rastliny bazy čiernej vykazujúcej chlorotickú mozaikovitosť, boli prítomné 2 vírusy rodu *Carlavirus*, a to *Elderberry carlavirus A* a *Elderberry carlavirus B*. Jednalo sa teda o zmesnú infekciu a takáto zmesná infekcia rôznymi karlavírusmi už bola popísaná v severnej Amerike (Ho *et Tzanetakis*, 2014), avšak v rámci Európy ide o prvý popis.

Carlavirus je rod vírusov patriaci do radu *Tymovirales* a čeľade *Betaflexiviridae*, ktorých prirodzenými hosťiteľmi sú rastliny. V súčasnosti existuje 52 druhov tohto rodu. Medzi choroby spojené s karlavírusmi patria predovšetkým mozaiky a chlorózy. Rod bol prvýkrát definovaný v roku 2009 v deviatej správe ICTV (King *et al.*, 2011). Je charakterizovaný šiestimi otvorenými čítacími rámcami a prítomnosťou triple gene bloku (TGB). Virióny sú neobalené, vláknité s veľkosťou 610 – 700 nm a 12 až 13 nm v priemere. Lineárny 5,8 – 9 kb genóm tvorí pozitívne orientovaná, jednoreťazcová RNA, 3' koniec je polyadenylovaný. Pri niektorých druhov je na 5' konci guanozínová čiapočka. Genóm kóduje 3 až 6 bielkovín vrátane obalového proteínu, ktorý sa nachádza na 3' konci a RdRp umiestnenej na 5' konci genómu (King *et al.*, 2011; http://viralzone.expasy.org/all_by_species/268.html; navštívené 3. apríla 2017).

Molekulárne kritériá na vymedzenie druhov rodu *Carlavirus* podľa 9. správy ICTV sú nasledovné:

- Každý jednotlivý druh má obvykle špecifický okruh prirodzených hosťiteľov.
- Odlišné druhy si vzájomne nebránia v infikovaní bežných druhov hosťiteľských rastlín, teda sú možné zmesné infekcie.
- Odlišné druhy sú ľahko rozlíšiteľné sérologickými postupmi; izoláty jednotlivých druhov sú často rozlíšiteľné v reakciách s polyklonálnymi antisérmi, rovnako aj s monoklonálnymi protilátkami.

- Odlišné druhy majú nukleotidovú identitu plášťového proteínu alebo replikázového proteínu menšiu než 72 % (aminokyselinovú identitu plášťového proteínu alebo replikázového proteínu menšiu než 80 %) (King *et al.*, 2011).

Nami získané izoláty pochádzali z bazy čiernej, zatiaľ nebol študovaný ich hostiteľský okruh, vzájomne si nebránia v infikovaní bazy čiernej, čoho dôkazom je zistená zmesná infekcia. Rozlíšiteľnosť sérologickými postupmi nemožno posúdiť, nakoľko neboli respektíve nie sú dostupné protilátky. Nukleotidová/aminokyselinová identita sekvencie A1 s referenčnou sekvenciou *Elderberry carlavirus A* je 78,6 / 88,6 % pre replikázový proteín a 82,1 / 97,7 % pre plášťový proteín; identita sekvencie A2 s referenčnou sekvenciou je 73,5 / 83,6 % pre replikázový proteín a 79,0 / 95,3 % pre plášťový proteín. Nukleotidová/aminokyselinová identita sekvencie B1 s referenčnou sekvenciou *Elderberry carlavirus B* je 72,3 / 81,3 % pre replikázový proteín a 79,6 / 94,3 % pre plášťový proteín, čo je nad hraničnými hodnotami pre rozlíšenie druhov rodu *Carlavirus* a jedná sa teda o rovnaké vírusy.

Prirodzený okruh hostiteľov jednotlivých druhov karlavírusov je obmedzený na jeden alebo niekoľko druhov rastlín. Väčšina týchto vírusov je prenášaná neperzistentne voškami, ale napríklad *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) je prenášaný molicami semi – perzistentne. Karlavírusy infikujúce hostiteľa, ktorý sa rozmnožuje vegetatívne, pretrvávajú aj v hostiteľskom propagatívnom materiáli. Tri z karlavírusov infikujúcich strukoviny (*Pea streak virus*, *Red clover vein mosaic virus* a CPMMV) sú prenosné osivom. Väčšina druhov je mechanicky prenosná na širokú škálu hostiteľov. Mnohé z týchto vírusov majú obmedzenú geografickú distribúciu, ale tie, ktoré pretrvávajú v propagatívnom materiáli majú širší okruh výskytu (Adams *et al.*, 2004). Vírus s názvom „Elderberry carlavirus A“ bol prvýkrát popísaný v roku 1970 v Škótsku, v rastlinách *Sambucus canadensis* importovaných z Kanady (Jones, 1970). Nie je možné overiť sekvenčnú zhodu s našimi izolátmi, nakoľko daný vírus, ani jeho sekvenčné dáta nie sú k dispozícii. Medzi jeho prirodzených hostiteľov patria *Sambucus canadensis*, *S. nigra* a *S. racemosa*. Vírus je prenášaný neperzistentne hmyzím vektorom voškou broskyňovou (*Myzus persicae*), štepením rastlín a mechanickou inokuláciou. Geografická distribúcia vírusu zahŕňa Kanadu, USA, Holandsko, Veľkú Britániu, Japonsko a bývalé Československo (Brčák, 1964; Brčák *et* Polák 1966; Uyemoto *et* Gilmer, 1971; Brunt *et* Stace-Smith, 1972; Jones, 1972). *Elderberry carlavirus B* popísali v roku 2016 Ho *et al.* Detailné informácie o okruhu prirodzených hostiteľov, geografickej distribúcií a spôsobe šírenia vírusu nie sú známe.

Nedávno bolo charakterizovaných 5 nových karlavírusov infikujúcich bazu čiernu, ktoré boli predbežne pomenované Elderberry carlavirus A-E (EIVA-EIVE). Ich genómová organizácia je podobná ako pri iných karlavírusoch, s veľkosťou medzi 8 540 až 8 628 nukleotidmi, bez polyadenilovaných koncov. EIVA, EIVB a EIVD zdieľajú spoločného predka rovnako ako EIVC a EIVE, čo naznačuje, že speciácia môže byť sympatrická so všetkými vírusmi, ktoré boli objavené v baze čiernej. Analýzy konzervovaných domén karlavírusov ukazujú, že sekvenčné motívy 2-oxoglutarát-dependentných a Fe (II)-dependentných oxygenáz sú spoľahlivými indikátormi fylogenetickú klasifikácie karlavírusov a spolu s rekombináciou hrajú významnú úlohu vo vývoji rodu. Bol vyvinutý univerzálny RT-PCR test, detekujúci všetky karlavírusy bazy a prípadných ďalších členov rodu *Carlavirus* (Ho *et al.*, 2016). Nami získané vírusové sekvencie mali dĺžku 8 623 bp, 8 629 bp a 8 595 bp s polyadenilovanými koncami, 5' konce sú neúplné, a teda kratšie v porovnaní s referenčnými sekvenciami. Overenie dĺžky našich sekvencií možno dokončiť s využitím 5'-RACE PCR. Získané sekvencie kódujú všetkých 6 charakteristických ORF, zistili sme, že izoláty *Elderberry carlavirus A*, *Elderberry carlavirus B* a *Elderberry carlavirus D*, vrátane našich izolátov, neobsahujú konzervatívnu sekvenciu siedmich aminokyselín plášťového proteínu (GLGVPTE) prítomnú takmer vo všetkých známych karlavírusoch (Gaspar *et al.*, 2008), zatiaľ čo vírusy *Elderberry carlavirus C* a *Elderberry carlavirus E* túto sekvenciu obsahujú. Fylogenetická analýza našich izolátov preukázala príslušnosť našich izolátov k rodu *Carlavirus*, konkrétne *Elderberry carlavirus A* a *Elderberry carlavirus B*. Ďalej bola zistená vysoká miera vnútrodruhovej variability v rámci získaných sekvencií.

8. Záver

V mojej diplomovej práci som sa venoval charakterizácii virómu bazy čiernej. Vypracoval som literárny rešerš o súčasnom stave problematiky, v ktorom sú zhrnuté základné charakteristiky virómu, súčasné poznatky o možnostiach štúdia virómu a informáciách získaných jeho štúdiom.

V experimentálnej časti práce som analyzoval vzorku bazy čiernej a úspešne identifikoval a zaradil získané vírusové izoláty do príslušných taxonomických skupín. V analyzovanej vzorke bola detekovaná zmesná infekcia vírusmi *Elderberry carlavirus A* a *Elderberry carlavirus B*, patriacich do radu *Tymovirales* a čeľade *Betaflexiviridae*, ktorých prirodzenými hostiteľmi sú rastliny. Boli určené pozície jednotlivých ORF a charakteristického motívu RdRp domény, špecifickej pre rod *Carlavirus*, taktiež bola charakterizovaná nukleotidová a aminokyselinová identita jednotlivých izolátov s referenčnými sekvenciami.

9. Zoznam použitej literatúry

- Abeles, S. R., Pride, D. T. (2014): Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *Journal of Molecular Biology* 426, 3892–3906.
- Adams, I. P., Glover, R. H., Monger, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., Boonham, N. (2009): Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10 (4), 537–545.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., Fauquet, C. M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149, 1045–1060.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Rowhani, A. (2009): Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* 387 (2), 395–401.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Úrbez-Torres, J. R., Cordero, F., Rowhani A. (2011): Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Archives of Virology* 156, 397–403.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., Daszak, P. (2004): Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 535–544.
- Anthony, S. J., Epstein, J. H., Murray, K. A., Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, C. M., Solovyov, A., Ojeda-Flores, R., Arrigo, N. C., Islam, A., Ali Khan, S., Hosseini, P., Bogich, T. L., Olival, K. J., Sanchez-Leon, M. D., Karesh, W. B., Goldstein, T., Luby, S. P., Morse, S. S., Mazet, J. A., Daszak, P., Lipkin, W. I. (2013): A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *mBio* 4 (5): e00598-13, doi: 10.1128/mBio.00598-13.
- Antony, J. M., Ellestad, K. K., Hammond, R., Imaizumi, K., Mallet, F., Warren, K. G., Power, Ch. (2007): The Human Endogenous Retrovirus Envelope Glycoprotein, Syncytin-1, Regulates Neuroinflammation and Its Receptor Expression in Multiple Sclerosis: A Role for Endoplasmic Reticulum Chaperones in Astrocytes. *Journal of Immunology* 179 (2), 1210-1224.
- Bag, S., Al Rwahnih, M., Li, A., Gonzalez, A., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Sudarshana, M. R. (2015): Detection of a New Luteovirus in Imported Nectarine Trees: A Case Study to Propose Adoption of Metagenomics in Post-Entry Quarantine. *Phytopathology* 105 (6), 840-846.
- Barzon, L., Lavezzo, E., Militello, V., Toppo, S., Palu, G. (2011): Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 7861–7884.
- Bernardin, F., Operskalski, E., Busch, M., Delwart, E. (2010): Transfusion transmission of highly prevalent commensal human viruses. *Transfusion* 50 (11), 2474-2483.

- Bertolini, E., Olmos, A., López, M. M., Cambra, M. (2003): Multiplex Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in a Single Tube for Sensitive and Simultaneous Detection of Four RNA Viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Trees. *Phytopathology* 93 (3), 286-292.
- Blond, J. L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., Cosset, F. L. (2000): An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *Journal of Virology* 74, 3321–3329.
- Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J., Mumford, R. (2008): Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121, 355-363.
- Brčák, J. (1964): A virus disease of *Sambucus nigra* resembling infection by arabis mosaic virus. *Plant Virology Proceedings of the 5th Conference of the Czechoslovak Plant Virologists, Prague 1962*, 280.
- Brčák *et* Polák (1966): Importance of wild hosts plant viruses. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwwetenschappen, Gent*, 967-973.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F., Rohwer, F. (2002): Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22), 14250-14255.
- Brunt, A. A. *et* Stace-Smith, R. (1972): Viruses occurring in wild plants. *Annual Report of Glasshouse Crops Research Institute 1971*, 121.
- Bukh, J. (2012): Animal models for the study of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 142, 1279-1287.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J. B., Dunez, J. (1998): Comparison of monoclonal antibodies and PCR assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox virus. *Phytopathology* 88, 198–204.
- Candresse, T., Marais, A., Sorrentino, R., Faure, Ch., Theil, S. Cadot, V., Rolland, M., Villemot, J., Rabenstein, F. (2016): Complete genomic sequence of barley (*Hordeum vulgare*) endornavirus (HvEV) determined by next-generation sequencing. *Archives of Virology* 161, 741-743.
- Cann, A. J., Fandrich, S. E., Heaphy, S. (2005): Analysis of the Virus Population Present in Equine Faeces Indicates the Presence of Hundreds of Uncharacterized Virus Genomes. *Virus Genes* 30(2), 151–156.
- Capobianchi, M. R., Giombini, E., Rozera, G. (2013): Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 15–22.
- Cavileer, T., Halpern, B., Lawrence, D., Podleckis, E., Martin, R., Hillman, B. (1994): Nucleotide sequence of the carlavirus associated with blueberry scorch and similar diseases. *Journal of General Virology* 75, 711–720.
- Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475–483.

- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J., Burger, J. T. (2010): Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology* 400 (2), 157–163.
- Cooper, J. I. (1993): *Virus Diseases of Trees and Shrubs*, 2nd edition. Springer Science & Business Media, ISBN 978-0412472206.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans J. D. (2007): A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Delwart, E. (2013): A roadmap to the human virome. *PLoS Pathogens* 9, e1003146, doi: 10.1371/journal.ppat.1003146.
- Donaire, L., Rozas, J., Ayllón, M. A. (2016): Molecular characterization of *Botrytis ourmia*-like virus, a mycovirus close to the plant pathogenic genus *Ourmiavirus*. *Virology* 489, 158–164.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Cheung, M., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Thierer, T., Wilson, A. (2010): Geneious v5.0, <http://www.geneious.com>
- Dutta, M., Ali, A., Melcher, U. (2015): Detection, discrimination and discovery of a new *Tobacco streak virus* strain. *Journal of Virological Methods* 221, 15–21.
- Ellis, P. J., Stace-Smith, R., Converse, R. H. (1992): Isolation and some properties of a North American carlavirus in *Sambucus racemosa*. *Acta Horticulturae* 308, 113–120.
- Evans, D. T., Silvestri, G. (2013): Nonhuman primate models in AIDS research. *Current Opinion in HIV and AIDS* 8, 255–261.
- Foxman, E. F., Iwasaki, A. (2011): Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease. *Nature Reviews Microbiology* 9, 254–264.
- Gao, R., Liu, P., Yong, Y., Wong, S-M. (2016): Genome-wide transcriptomic analysis reveals correlation between higher WRKY61 expression and reduced symptom severity in Turnip crinkle virus infected *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports - Nature* 18, 6: 24604. doi: 10.1038/srep24604.
- Gaspar, J. O., Belintani, P., Almeida, A. M. R., Kitajima, E. W. (2008): A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *Journal of Virological Methods* 148, 283–285.
- Giampetruzzi, A., Roumia, V., Robertoa, R., Malossinib, U., Yoshikawac, N., Nottea, P. L., Terlizzi, F., Credid, R., Saldarelli, P. (2011): A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research* 163, 262–268.
- Gil, J. F., Adams, I., Boonham, N., Nielsen, S. L., Nicolaisen, M. (2016): Molecular and biological characterization of *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*) isolates from the potato-growing regions of Colombia. *Plant Pathology* 65, 1210–1220.
- Goodier, J. L., Kazazian Jr., H. H. (2008): Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135, 23–35.
- Grbic, J., Wexler, I., Celenti, R., Altman, J., Saffer, A. (2011): A phase II trial of a transmucosal herbal patch for the treatment of gingivitis. *The Journal of the American Dental Association* 142, 1168–1175.

- Ho, T., Tzanetakis, I. E. (2014): Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing. *Virology* 471–473, 54–60.
- Ho, T., Quito-Avila, D., Keller, K. E., Postman, J. D., Martin, R. R., Tzanetakis, I. E. (2016): Evidence of sympatric speciation of elderberry carlaviruses. *Virus Research* 215, 72–75.
- Holtzman, M. J. (2012): Asthma as a chronic disease of the innate and adaptive immune systems responding to viruses and allergens. *Journal of Clinical Investigation* 122, 2741–2748.
- Charlebois, D., Byers, P. L., Finn, C. E., Thomas, A. L. (2010): Elderberry: botany, horticulture, potential. In: *Horticultural Reviews* 37. Wiley-Blackwell, 213–279.
- Chiumenti, M., Mohorianu, I., Roseti, V., Saldarelli, P., Dalmay, T., Minafra, A. (2016): High-throughput-sequencing-based identification of a grapevine fanleaf virus satellite RNA in *Vitis vinifera*. *Archives of Virology* 161, 1401–1403.
- Jeck, W. R., Reinhardt, J. A., Baltrus, D. A., Hickenbotham, M. T., Magrini, V., Mardis, E. R., Dangl, J. L., Jones, C. D. (2007): Extending assembly of short DNA sequences to handle error. *Bioinformatics* 23, 2942–2944.
- Jones, A. T. (1970): Virus from elder. *Scottish Horticultural Research Institute* 1969, 58.
- Jones, A. (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, 49–58.
- Jones, A. T., Murant, A. F., (1971): Serological relationship between cherry leaf roll: elm mosaic and golden elderberry viruses. *Annals of Applied Biology* 69, 11–15.
- Kalinowska, E., Paduch-Cichal, E., Chodorska, M. (2013): First report of Blueberry scorch virus in elderberry in Poland. *Plant Disease* 97, 1515.
- Kapoor, A., Simmonds, P., Lipkin, W. I., Zaidi, S., Delwart, E. (2010) Use of nucleotide composition analysis to infer hosts for three novel picorna-like viruses. *Journal of Virology* 84, 10322–10328.
- Karlsson, H., Bachmann, S., Schroder, J., McArthur, J., Torrey, E. F., Yolken, R. H. (2001): Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), 4634–4639.
- Kazazian Jr., H. H. (2004): Mobile elements:drivers of genome evolution. *Science* 303 (5664), 1626–1632.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. (2012):Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12), 1647–1649.
- Keller, K. E., Mosier, N. J., Thomas, A. L., Quito-Avila, D. F., Martin, R. R. (2015): Identification of two new carlaviruses in elderberry. *Acta Horticulturae* 1061, 161–164.
- Kim, K. M., Park, J. H., Bhattacharya, D., Yoon, H. S. (2014): Applications of next-generation sequencing to unravelling the evolutionary history of algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 333–335.

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2011): *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. ISBN 978-0-12-384684-6.
- Koh, S. H., Ong, J. W. L., Admiraal, R., Sivasithamparam, K., Jones, M. G. K., Wylie, S. J. (2016): A novel member of the *Tombusviridae* from a wild legume, *Gompholobium preissii*. *Archives of Virology* 161, 2893–2898.
- Koonin E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M. (2015): Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* 479-480, 2–25.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S. (2009): Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388, 1–7.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7), 1870-1874.
- Lander, E. S., Linton L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J.*et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lecoq, H., Verdin, E., Tepfer, M., Wipf-Scheibel, C., Millot, P., Dafalla, G., Desbiez, C. (2016): Characterization and occurrence of squash chlorotic leaf spot virus, a tentative new torradovirus infecting cucurbits in Sudan. *Archives of Virology* 161, 1651–1655.
- Lederberg, J. (2000): Infectious History. *Science* 288, 287–293.
- Li, L., Shan, T., Wang, Ch., Côté, C., Kolman, J., Onions, D., Gulland, F. M. D., Delwart, E. (2011): The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. *Journal of Virology* 85, 9909–9917.
- Li, R., Gao, S., Hernandez, A. G., Wechter, W. P., Fei, Z. (2012): Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. *PLoS One* 7 (5), e37127, doi: 10.1371/journal.pone.0037127.
- Liang, P., Navarro, B., Zhang, Z., Wang, H., Lu, M., Xiao, H., Wu, Q., Zhou, X., Di Serio, F., Shifang, L. (2015): Identification and characterization of a novel geminivirus with a monopartite genome infecting apple trees. *Journal of General Virology* 96, 2411–2420.
- Lipkin, W. I. (2013): The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nature Reviews Microbiology* 11, 133–141.
- Lister, R. (1964): Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. *Annals of Applied Biology* 54, 167–176.
- Loconsole, G., Saldarelli, P., Doddapaneni, H., Savino, V., G. P., Saponari, M. (2012): Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. *Virology* 432, 162–172.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Koonin, E. V. (2000): A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes: viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 50–52.
- Martin, R. R., Polashock, J. J., Tzanetakis, I. E. (2012): New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses* 4, 2831–2852.

- Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito-Avila, D., Poudel, B., Tzanetakis, I. E. (2013): Viruses and virus diseases of *Rubus*. *Plant Disease* 97, 168–182.
- Martin, R. R., Tzanetakis, I. E. (2013): High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada Implications for certification, nurseries and fruitproduction. *Plant Disease* 97, 1358–1362.
- Matthews, R. E. F. (1991): *Plant Virology*, 3rd edition. Academic Press. ISBN 0-12-480533-1.
- Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., Bushman, F. D. (2013): Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 12450–12455.
- Morse, S. S., Mazet, J. A., Woolhouse, M., Parrish, C. R., Carroll, D., Karesh, W. B., Zambrana-Torrel, C., Lipkin, W. I., Daszak, P. (2012): Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet* 380, 1956–1965.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., Barker, I. (2006): Advances in molecular phytodiagnostics-new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology* 116, 1–19.
- Mushegian, A., Shipunov, A., Elena, S. F. (2016): Changes in the composition of the RNA virome mark evolutionary transitions in green plants. *BMC Biology* 14, 68.
- Ng, T. F. F., Duffy, S., Polston, J. E., Bixby, E., Vallad, G. E. (2011): Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vectorenabled metagenomics on whiteflies. *PLoS One* 6 (4), e19050, doi: 10.1371/journal.pone.0019050.
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., Virgin, H. W. (2015): Disease specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160, 447–460.
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Yuan, L., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, Ch. A., Dawson, R. B., Peek, A. S. (2008): IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* 36, Web Server issue W163–W169, doi: 10.1093/nar/gkn198.
- Pallett, D. W., Ho, T., Cooper, I., Wang, H. (2010): Detection of *Cereal yellow dwarf virus* using small interfering RNAs and enhanced infection rate with *Cocksfoot streak virus* in wild cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*). *Journal of Virological Methods* 168, 223–227.
- Parrish, C. R., Holmes, E. C., Morens, D. M., Park, E. C., Burke, D. S., Calisher, C. H., Laughlin, C. A., Saif, L. J., Daszak, P. (2008): Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 457–470.
- Pérot, P., Bolze, P., A., Mallet, F. (2012): From Viruses to Genes: Syncytins. In: Witzany, G., (ed). *Viruses: Essential Agents of Life*, Springer Science & Business Media, 325-361, ISBN 978-94-007-4898-9.
- Phan, T. G., Kapusinszky, B., Wang, C., Rose, R. K., Lipton, H. L., Delwart, E. L. (2011): The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. *PLoS Pathog* 7 (9): e1002218, doi:10.1371/journal.ppat.1002218.

- 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, 389–393.
- Poojari, S., Alabi, O. J., Fofanov, V. Y., Naidu, R. A. (2013): A Leafhopper-Transmissible DNA Virus with Novel Evolutionary Lineage in the Family *Geminiviridae* Implicated in Grapevine Redleaf Disease by Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 8 (6), e64194, doi: 10.1371/journal.pone.0064194.
- Popović, M., Smiljanić, K., Dobutović, B., Syrovets, T., Simmet, T., Isenović, E. R. (2012): Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 33, 160–172.
- Prabha, K., Baranwal, V. K., Jain, R. K. (2013): Applications of Next Generation High Throughput Sequencing Technologies in Characterization, Discovery and Molecular Interaction of Plant Viruses. *Indian Journal of Virology*, 24, 157-165.
- Pride, D. T., Salzman, J., Haynes, M., Rohwer, F., Davis-Long, C., White R. A., Loomer, P., Armitage, G. C., Relman, D. A. (2012): Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME Journal* 6, 915–926.
- Quan, P. L., Briese, T., Palacios, G., Lipkin, W. I. (2008): Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. *Antiviral Research* 79, 1–5.
- Quigley, E. M. (2013): Gut bacteria in health and disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 9 (9), 560–569.
- Relman, D. A. (2012): Microbiology: Learning about who we are. *Nature* 486, 194-195.
- Roossinck M. J. (2012): Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annual Review of Genetics* 46, 357–367.
- Roossinck, M. J. (2011): The big unknown: plant virus biodiversity. *Current Opinion in Virology* 1, 63–67.
- Roossinck, M. J., Saha, P., Wiley, G. B. Quan, J., White, J. D., Lai, H., Chavarría, F., Shen, G., Roe, B. A. (2010): Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology* 19 (S1), 81–88.
- Samuels, N., Saffer, A., Wexler, I. D., Oberbaum, M. (2012): Localized reduction of gingival inflammation using site-specific therapy with a topical gingival patch. *The Journal of Clinical Dentistry* 23, 64.
- Saqib, M., Wylie, S. J., Jones, M. G. K. (2015): Serendipitous identification of a new *Iflavirus*-like virus infecting tomato and its subsequent characterization. *Plant Pathology* 64, 519–527.
- Seifert, K. A. (2009): Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9, 83–89.
- Sela, N., Lachman, O., Reingold, V., Dombrovsky, A. (2013): A new cryptic virus belonging to the family *Partitiviridae* was found in watermelon co-infected with *Melon necrotic spot virus*. *Virus Genes* 47, 382–384.
- Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., Delwart, E. (2011): The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of Virology* 85, 11697–11708.

- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010): A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* 19, 227–240.
- Scheel, T. K. H., Simmonds P., Kapoor, A. (2015): Surveying the global virome: Identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral Research* 115, 83–93.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 846–849.
- Studholme, D. J., Glover, R. H., Boonham, N. (2011): Application of highthroughput DNA sequencing in phytopathology. *Annual Review of Phytopathology* 49, 87–105.
- Tang, W. H., Hazen, S. L. (2014): The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Investigation* 124, 4204–4211.
- Uyemoto, J. K., (1970): Symptomatically distinct strains of Tomato ringspot virus isolated from grape and elderberry. *Phytopathology* 60, 1838–1841.
- Uyemoto, J. K., Gilmer, R. M. (1971): Sap-transmissible viruses from elderberries in New York. *Plant Disease Report* 61, 132.
- van den Brand, J. M. A., van Leeuwen, M., Schapendonk, C. M., Simon, J. H., Haagmans, B. L., Osterhaus, A. D. M. E., Smits, S. L. (2012): Metagenomic analysis of the viral flora of pine marten and European badger feces. *Journal of Virology* 86, 2360–2365.
- 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, 117–134.
- Varveri, C., Olmos, A., Pina, J. A., Marroquín, C., Cambra, M. (2015): Biological and molecular characterization of a distinct *Citrus tristeza virus* isolate originating from a lemon tree in Greece. *Plant Pathology* 64, 792–798.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van Bekkum, P. J., van der Vlugt, R. R. A. (2013): Evidence for *Lettuce big-vein associated virus* as the causal agent of a syndrome of necrotic rings and spots in lettuce. *Plant Pathology* 62, 444–451.
- Verbeek, M., Dullemans, A. M., van Raaij, H. M. G., Verhoeven, J. Th. J., René, A., van der Vlugt, R. R. A. (2014): *Lettuce necrotic leaf curl virus*, a new plant virus infecting lettuce and a proposed member of the genus *Torradovirus*. *Archives of Virology* 159, 801–805.
- Virgin, H. W. (2014): The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* 157, 142–150.
- Warren, R. L., Sutton, G. G., Jones, S. J. M., Holt, R. A. (2007): Assembling millions of short DNA sequences using SSAKE. *Bioinformatics* 4, 500–501.
- Way, R. D. (1981): Elderberry culture in New York state. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 91, <http://hdl.handle.net/1813/5098>.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin, H. W. T. (2006): Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of Virology* 80, 5104–5112.
- Wolfe, N. D., Dunavan, C. P., Diamond, J. (2007): Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279–283.
- Woolhouse, M. E., Howey, R., Gaunt, E., Reilly, L., Chase-Topping, M., Savill, N. (2008): Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 275, 2111–2115.

- Wylie, S. J., Jones, M. G. K. (2011): The complete genome sequence of a passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology* 156, 479–482.
- Wylie, K. M., Weinstock, G. M., Storch, G. A. (2012a): Emerging view of the human virome. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 160 (4), 283-290.
- Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Storch, G. A. (2012b): Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children. *PLoS One* 7 (6), e27735, doi: 10.1371/journal.pone.0027735.
- Wylie, S. J., Luo, H., Li, H., Jones, M. G. K. (2012c): Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology* 157, 271–84.
- Wylie, K. M., Mihindukulasuriya, K. A., Zhou, Y., Sodergren, E., Storch, G. A., Weinstock, G. M. (2014): Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. *BMC Biology* 12, 71.
- Yanagisawa, H., Tomita, R., Katsu, K., Uehara, T., Atsumi, G., Tateda, Ch., Kobayashi, K., Sekine, K.-T. (2016): Combined DECS Analysis and Next-Generation Sequencing Enable Efficient Detection of Novel Plant RNA Viruses. *Viruses* 8 (3), 70.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Yeonhwa, J., Hoseong, Ch., Sang-Min, K., Sun-Lim K., Bong Ch. L., Cho, W. K. (2016): Integrated analyses using RNA-Seq data reveal viral genomes, single nucleotide variations, the phylogenetic relationship, and recombination for *Apple stem grooving virus*. *BMC Genomics* 17, 579.
- Zerbino, D., Birney, E. (2008): Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18, 821.
- Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., Pesavento, P. A., Delwart, E. (2014): Faecal virome of cats in an animal shelter. *Journal of General Virology* 95, 2553–2564.
- Zhou, Z. S., Dell' Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A., Martelli, G. P. (2006): Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology* 87, 2387–2395.
- Zou, S., Caler, L., Colombini-Hatch, S., Glynn, S., Srinivas, P. (2016): Research on the human virome: where are we and what is next. *Microbiome* 4, 32.

10. Internetové zdroje

Human Microbiome Project. [online] [cit. 2017-01-28] Dostupné z:

<https://commonfund.nih.gov/hmp/index>

Květena České republiky [online] [cit. 2017-04-01] Dostupné z:

<http://www.kvetenacr.cz/>

Viralzone [online] [cit. 2017-04-03] Dostupné z:

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/268.html

Web of Science[online] [cit. 2017-11-04] Dostupné z:

https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=T24toe98mK5Cn8BWmOP&preferencesSaved=