

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Virové choroby topolů na území České republiky

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Topičová

Vedoucí práce: Ing. Lenka Grimová, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Prohlášení

Prohlašuji, že diplomovou práci "Virové choroby topolů na území České republiky" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

Ve Slapech dne 6. dubna 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lence Grimové, Ph.D., která mi věnovala svůj čas a poskytovala mi cenné rady při laboratorních činnostech i psaní samotné práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Josefu Mertelíkovi, CSc. za poskytnutý biologický materiál a pěstitelům rychle rostoucích dřevin za možnost odběru vzorků z jejich plantáží.

V neposlední řadě chci poděkovat svému příteli a rodině za podporu a trpělivost při psaní této diplomové práce.

Souhrn

Diplomová práce poskytuje základní informace o zdravotním stavu rychle rostoucích dřevin na území České republiky, konkrétně o jejich chorobách a škůdcích, se zaměřením na rod *Populus*, coby nejvyužívanější dřevinu pro pěstitelské plantáže. Hlavní náplní práce byl monitoring a detekce viru mozaiky topolu (*Poplar mosaic virus*, PopMV) na přirozených a kulturních porostech topolů v různých oblastech České republiky. Pro tyto účely bylo vybráno několik lokalit z oblasti Středních, Jižních, Západních Čech a Vysočiny. Dílčím předmětem výzkumu bylo studium variability PopMV, a to na několika různých izolátech daného viru získaných z volně rostoucích topolů v oblasti Kozí Hřbety v lokalitě Suchdol, dále z rostlin topolů rostoucích v Západočeském kraji na území Českého středohoří a v neposlední řadě z topolů ze sbírky Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) v Průhonicích.

Praktická část diplomové práce se věnuje monitoringu PopMV na území ČR. Detekce patogena byla provedena pomocí dvou diagnostických metod, konkrétně s využitím sérologické metody DAS-ELISA (double antibody sandwich – enzyme-linked immuno-sorbent assay) a molekulární metody RT-PCR (reverzní transkripce – polymerázová řetězová reakce). Námi testované vzorky, odebrané od soukromých pěstitelů RRD, byly shledány ve většině případů jako viruprosté. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že pěstitelé na svých plantážích používají kvalitní a zdravý materiál z matečních rostlin. Jedinou výjimkou byla lokalita Českého Středohoří, kde byl naopak k výsadbě zřejmě použit infikovaný pěstební materiál, což mělo za následek masivní zamoření celého pozemku daným virem.

V rámci práce byla dále částečně popsána variabilita genu pro bílkovinný obal několika izolátů viru mozaiky topolu na molekulární úrovni. Na základě sekvenční identity nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin byly mezi sebou porovnány jednotlivé izoláty viru, včetně již publikovaných sekvencí. Z námi získaných výsledků bylo patrné, že jednotlivé izoláty se od sebe procentuelně příliš nelišily. Výjimku tvořil izolát PopMV získaný ze sbírky Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) v Průhonicích, který se svou sekvencí lišil jak od námi získaných izolátů, tak od již publikovaných sekvencí z Německa i Velké Británie.

Klíčová slova: *Populus* spp., virové choroby, diagnostické metody

Summary

The diploma thesis provides basic information about the state of health of fast growing trees in the Czech Republic with a focus on *Populus* genus as the most used species for growing plantations.

Main task of the thesis was monitoring and detection of *Poplar mosaic virus* (PopMV) on natural and commercially planting stands of poplar trees in different areas of the Czech Republic. Several localities from regions of the Central, South and West Bohemia and from Highlands region were selected. Partial aim of the research was to study the variability of PopMV isolates. PopMV isolates were collected from wild growing poplar trees from localities Koží Hřbety at Suchdol, Czech Central Mountains in West Bohemia and from the germplasm collection of The Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening (RILOG) in Průhonice and subsequently analyzed.

The practical part of this thesis deals with monitoring of PopMV in the Czech Republic. Pathogen detection was performed using two diagnostic methods: serological method DAS-ELISA (double antibody sandwich - enzyme-linked immuno-sorbent assay) and molecular method RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction). The tested samples were in most cases identified as virus-free for the presence of PopMV. This implies that growers of fast growing trees use high-quality and healthy material from the mother plants on their plantations. The only exception was the locality of the Czech Central Mountains, where apparently infected material for planting was used, which resulted in massive contamination throughout the area by the virus.

This thesis also describes the variability of the gene for the coat protein of several *Poplar mosaic virus* isolates at the molecular level. The various virus isolates were compared to each other based on the sequence identity of nucleotides and amino acids derived from them, including already published sequences. From the obtained results it is obvious that the individual isolates did not differ from each other. An exception was the isolate of PopMV obtained from the collection of RILOG in Průhonice. This isolate differed in sequence from the isolates obtained by us, as well as from already published sequences from Germany and Great Britain.

Keywords: *Populus* spp., virus diseases, diagnostics

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1 Biomasa	3
3.2 Rychle rostoucí dřeviny (RRD).....	4
3.2.1 <i>Salix</i> L. – vrba (čeleď <i>Salicaceae</i>)	4
3.2.2 <i>Populus</i> L. – topol (čeleď <i>Salicaceae</i>)	4
3.2.3 Zásady pěstování RRD	7
3.2.4 Využití RRD	10
3.2.5 Funkce RRD v krajině	10
3.2.6 Biodiverzita RRD	12
3.2.7 Choroby a škůdci RRD.....	12
3.3 Virus mozaiky topolu	22
3.3.1 Taxonomické zařazení PopMV	22
3.3.2 Obecná charakteristika	22
3.3.3 Symptomatologie PopMV	23
3.3.4 Přenos PopMV	24
3.3.5 Vybrané diagnostické metody pro detekci PopMV	24
4 MATERIÁL A METODY	27
4.1 Detekce PopMV v rostlinném materiálu	27
4.1.1 Rostlinný materiál	27
4.1.2 Detekce PopMV pomocí sérologické metody DAS-ELISA	27
4.1.3 Detekce PopMV pomocí metody RT-PCR	29
4.1.4 Detekce PopMV pomocí indikátorových rostlin.....	33

4.2	Analýza genetické variability izolátů PopMV	33
4.2.1	Rostlinný materiál	33
4.2.2	Příprava vzorků pro sekvenci	34
4.2.3	Analýza sekvencí.....	39
5	VÝSLEDKY	40
5.1	Detekce PopMV v rostlinném materiálu.....	40
5.1.1	Detekce PopMV pomocí sérologické metody DAS-ELISA	40
5.1.2	Detekce PopMV pomocí metody RT-PCR	42
5.1.3	Detekce PopMV pomocí indikátorových rostlin.....	43
5.2	Analýza genetické variability izolátů PopMV	43
5.2.1	Příprava vzorků pro sekvenci	43
6	DISKUZE	49
6.1	Stav porostů topolu na území České republiky.....	49
6.2	Propagace PopMV v indikátorových rostlinách <i>N. megalosiphon</i>	50
6.3	Variabilita PopMV	51
7	ZÁVĚR	52
8	SEZNAM LITERATURY	53
8.1	Literární informační zdroje	53
8.2	Elektronické informační zdroje	56
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	57
10	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	58
	SEZNAM PŘÍLOH.....	61
	Obrázky.....	61
	Tabulky	61
	Samostatné přílohy	62

1 ÚVOD

Rostlinné viry jsou organismy, které jsou v určitých případech schopné způsobit na rostlinných hostitelích nevyčíslitelné škody. Je to dáno i jejich jedinečnou vlastností, že když už je jednou rostlina virem napadena, patogen v ní velmi často přetrvává nastálo a může být příčinou ztráty na výnosech či hostitele úplně zahubí. Při napadení rostlin virem je v mnoha případech nutná jejich likvidace, takovýto porost totiž představuje potencionální zdroj nákazy. Proto je nejdůležitějším faktorem v ochraně proti rostlinným virům prevence. Zdravý množitelský materiál a dodržování hygienických pravidel je základem pro úspěšné a bezvirózní pěstování rostlin.

V současné době se čím dál více rozšiřuje nový trend, a to pěstování rychle rostoucích dřevin (RRD) na biomasu. Virus mozaiky topolu (*Poplar mosaic virus*, PopMV) tak nabývá na významu už jen z toho hlediska, že topol, nejvyužívanější dřevina pro porosty RRD, je dosud jediným známým hostitelem tohoto viru. Přesto, že v současné době není znám živočišný vektor tohoto viru, virus se dál úspěšně šíří mezi přirozenou populací topolů.

Z výše uvedených důvodů bylo hlavním cílem předkládané diplomové práce rozšířit dosavadní znalosti o viru mozaiky topolu, jak na biologické, tak i molekulární úrovni, na jejichž základě by bylo možné zvýšit úspěšnost ochrany rostlin proti němu.

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Vědeckou hypotézou předkládané diplomové práce byl předpoklad, že na území České republiky jsou na rostlinách topolů hojně přítomni viroví zástupci rodu *Carlavirus*.

Hlavním cílem diplomové práce byl monitoring a charakteristika virových patogenů na populaci topolů v České republice. Dílčím cílem byla studie variability genu pro bílkovinný obal viru mozaiky topolu.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Biomasa

Pojmem biomasa se rozumí veškerá hmota organického původu, která má širokou škálu vlastností. Biomasa zahrnuje **dendromasu** (dřevní biomasa), **fytomasu** (bylinná biomasa) a biomasu **živočišného původu**. Zdrojem biomasy jsou rovněž biologicky rozložitelné odpady, a to čisté nebo vytríděné z ostatních složek (např. zemědělská kejda, vytríděný biologicky rozložitelný průmyslový a komunální odpad) (Anonym 1, 2013).

Biomasu můžeme dle Kohouta *et al.* (2010) rozdělit do tří skupin podle využití a pěstování a to na zemědělskou, lesní a zbytkovou biomasu:

Zemědělská biomasa:

- cíleně pěstovaná biomasa
- biomasa obilovin, olejnin a prádnych rostlin
- trvalé travní porosty
- rychle rostoucí dřeviny pěstované na orné půdě
- rostlinné zbytky ze zemědělské prvovýroby a údržby krajiny

Lesní biomasa:

- palivové dřevo
- zbytky z hospodaření v lesích

Zbytková biomasa – vedlejší produkty a zbytky:

- papírenského průmyslu
- potravinářského průmyslu
- průmyslu zpracování dřeva
- živočišného průmyslu
- biologicky rozložitelný odpad
- lihovarnické výpalky.

3.2 Rychle rostoucí dřeviny (RRD)

Podstatnou část biomasy představují porosty energetických plodin. Termínem energetické plodiny nebo rostliny jsou označovány botanické druhy, kultivary, klony¹, přírodní i záměrní kříženci dřevin, trvalek a bylin, které se využívají či testují pro cílenou produkci biomasy vhodnou k energetickému využití. Součástí této skupiny jsou i tzv. **rychle rostoucí dřeviny (RRD)** (Weger, 2004).

Skupina dřevin, která je označována jako rychle rostoucí, se vyznačuje schopností dosáhnout vysoké produkce biomasy v krátkém časovém období ve srovnání s jinými druhy dřevin. Nejvíce využívanými druhy této skupiny jsou v našem zeměpisném pásmu příslušníci rodů *Salix* (vrby) a *Populus* (topoly) (Čížková a Čížek, 2009).

3.2.1 *Salix* L. – vrba (čeleď *Salicaceae*)

Do rodu *Salix* se řadí dvoudomé opadavé keříky, keře a stromy. Pupeny jsou kryty jednou (vzácně dvěma) šupinami. Listy jsou střídavé, ojedinele vstřícné, jednoduché, celokrajné nebo pilovité, většinou krátce řapíkaté. Palisty jsou zpravidla dobře vyvinuté a pozdě opadavé. Květy jsou vzpřímené jednopohlavné, vyrůstající v paždí celokrajných listenů. Plodem je tobolka, otevírající se 2 chlopněmi se 2 – 32 semeny, na bázi se svazečkem chlupů (Koblížek, 2006).

Jsou to světlomilné, na půdu většinou nenáročné dřeviny. Snášejí i poměrně suché půdy, s výjimkou subalpínských druhů, které nejlépe rostou na vlhkých a stinných svazích skalek, nebo v korytech. Množí se převážně dřevitými řízkami, zakrslé druhy a kultivary zelenými řízkami nebo hřížením (Koblížek, 2006).

3.2.2 *Populus* L. – topol (čeleď *Salicaceae*)

Do rodu *Populus* patří dvoudomé opadavé, většinou rychle rostoucí statné stromy. Letorosty mají pětihrannou dřevinu a pupeny jsou složeny z několika střechovitě postavených šupin. Listy jsou střídavé, jednoduché, celistvé nebo členěné, dlouze řapíkaté. Květy jsou jednopohlavné, bezobalné, v převislých jehnědách. Plodem je tobolka, otevírající se 2 – 4 chlopněmi, s drobnými, elipsoidními semeny, na bázi se svazečkem chlupů (Koblížek, 2006).

¹ **Klon** je jedinec, vzniklý přirozenou cestou nepohlavním rozmnožováním nebo uměle procesem klonování. V obou případech je nově vzniklý jedinec geneticky shodný s mateřským organismem (Kohout, 2010).

Jsou to převážně světlomilné dřeviny, kterým se daří v živných, hlubokých a čerstvě vlhkých půdách. Množí se převážně dřevitými řízký, některé druhy kořenovými řízký a dále hřížením nebo výsevem semen (Koblížek, 2006).

Rod *Populus* se rozděluje na tři sekce – sekce **Populus** (např. druhy *P. alba*, *P. canescens*, *P. grandidentata*, *P. tremula*, *P. tremuloides*), sekce **Aigeiros** (např. druhy *P. deltoides*, *P. nigra*, *P. fremontii*; hybridní kultivary *P. × euroamericana*, *P. × canadensis*) a sekce **Tacamahaca** (druhy *P. angustifolia*, *P. balsamifera*, *P. maximowiczii*, *P. simonii*, *P. trichocarpa*, *P. canadicans*) (Biddle a Tinsley, 1971a; Chastagner, 2001).

Výmladkové plantáže

Výmladkové plantáže RRD jsou novou formou zemědělského hospodaření, založené na regenerační výmladkové schopnosti vybraných klonů topolů, která umožňuje opakované sklizení bez potřeby založení nového porostu. Tyto plantáže se pěstují pouze na zemědělské půdě převážně zemědělskými agrotechnickými postupy (Weger, 2009a).

Pro výmladkové plantáže RRD se v podmínkách mírného klimatického pásma používají téměř výhradně vybrané klony a odrůdy topolů. Výběr klonů popř. odrůd ovlivňují faktory jako např. požadovaný cílový produkt, pěstební a sklizňová mechanizace či dostupnost a vlastnická práva odrůd. Sortiment se řídí také zemědělskou legislativou (Weger, 2009a; 2009b).

Fakticky jsou u nás dnes dostupné následující zdroje sadby:

- „**Schválené a doporučené klony topolů**“ MŽP a MZe – jedná se o druhy a klony vybrané z domácích sbírek (testování VÚKOZ od roku 1994) a povolené pro pěstování v krajině. Nejsou chráněné šlechtitelskými právy a vyskytují se na 98 % českých plantážích.
- „**Italské topoly**“ – jedná se o registrované odrůdy, převážně ze skupiny tzv. kanadských topolů (*P. × canadensis*), získané záměrným křížením v italských firmách a ústavech zaměřených na problematiku pěstování topolů. Odrůdy jsou chráněny šlechtitelskými právy a v ČR se pěstují jen v pokusných a poloprovozních porostech (Weger, 2009a; 2009b).

Tabulka 1: Seznam rychle rostoucích dřevin (RRD) doporučovaných a pěstovaných ve výmladkových plantážích v ČR a jejich zařazení do taxonomických skupin s uvedením doporučené maximální délky jejich sklizňového cyklu (= délky obmýetí) dle MZe (Anonym 2, 2013).

Označení	Taxonomické zařazení (vědecké označení)	Doporučená maximální délka obmýetí
Topoly (<i>Populus sp.</i>)		
Kříženci balzámových topolů (<i>Tacahamaca</i> × <i>Tacamahaca</i>)		8 let
P - 454	<i>P. maximowiczii</i> Henry × <i>P. trichocarpa</i> Torr. et Gray 'Androscoggin'	
P - 468	<i>P. trichocarpa</i> Torr. et Gray × <i>P. koreana</i> Rehd.	
P - 473	<i>P. trichocarpa</i> Torr. et Gray × <i>P. koreana</i> Rehd. cf. <i>P. deltoides</i> Marsh × <i>P. trichocarpa</i> Torr. et Gray	
P - 524	cf. <i>P. balsamifera</i> L × <i>P. balsamifera</i> L. II	
---	<i>P. maximowiczii</i> Henry × <i>P. trichocarpa</i> Torr. et Gray 'NE-42'	1)
Kříženci černých a balzámových topolů (<i>Aigeiros</i> × <i>Tacamahaca</i>)		8 let
P - 466	<i>P. maximowiczii</i> Henry × <i>P. × berolinensis</i> 'NE-44'	
P - 494	<i>P. maximowiczii</i> Henry × <i>P. × berolinensis</i> 'Oxford'	
J - 105 (Max-4)	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i> A. Henry 'Maxvier'	
J - 104 (Max-5)	<i>P. nigra</i> × <i>P. maximowiczii</i> A. Henry 'Maxfünf'	
P - 410	<i>P. nigra</i> L. × <i>P. simonii</i> Carr.	
P - 412	<i>P. nigra</i> L. × <i>P. simonii</i> Carr.	
Kříženci černých topolů (<i>Aigeiros</i> × <i>Aigeiros</i>)		5 let
P - 264	<i>P. × euroamericana</i> Dode Guinier 'NL-B-132b' = <i>P. × canadensis</i> Mönch 'NL-B-132'	
---	<i>P. × euroamericana</i> Dode Guinier 'AF 2' = <i>P. × canadensis</i> Mönch 'AF 2'	1)
---	<i>P. × generosa</i> × <i>P. nigra</i> L. 'AF 6'	1)
---	<i>P. × generosa</i> × <i>P. nigra</i> L. 'Monviso'	1)
Topol černý (<i>P. nigra</i> L.)		10 let
P - VUKOZ - 001	<i>P. nigra</i> L.	
P - VUKOZ - 002	<i>P. nigra</i> L.	
P - VUKOZ - 003	<i>P. nigra</i> L.	

Legenda

1) Označení dosud není přiřazeno. Maximální délka obmýetí pro další klony a odrůdy se stanoví podle jejich příslušnosti do taxonomické skupiny.

3.2.3 Zásady pěstování RRD

RRD mohou být pěstovány jako jednotlivé stromy, stromořadí, stromové pásy podél cest, i jako celé lesy, ale v současnosti je největším trendem pěstovat tyto dřeviny jako plantáže na orné půdě (Celjak, 2008).

Základním předpokladem úspěšného pěstování RRD na orné půdě je splnění některých požadavků:

- extrémně vysoký vzrůst rostlin v mládí
- výborné obrůstající schopnosti pařezů po obmýtí
- snášenlivost konkurence bez regulovatelných zásahů
- odolnost proti škůdcům a chorobám
- uzpůsobený pozemek k mechanizačnímu zpracování
- mocnost ornice minimálně 30 cm, optimálně 70 cm
- hodnota pH minimálně 5,5
- vysoká hladina podzemní vody (60 až 120 cm, nesmí klesnout pod 2 m)
(Kohout *et al.*, 2010).

O záměru výsadby je nutné kontaktovat příslušné úřady – a to zejména orgán ochrany přírody na obecním úřadu s rozšířenou působností a podat žádost dle ustanovení § 5 odstavce 4 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny. Zákon uvádí: „*Záměrné rozšíření geograficky nepůvodního druhu rostliny či živočicha do krajiny je možné jen s povolením orgánu ochrany přírody. Geograficky nepůvodní druh rostliny nebo živočicha je druh, který není součástí přirozených společenstev určitého regionu.*“ (Anonym 3, 1992; Kohout *et al.*, 2010).

3.2.3.1 Výběr vhodného stanoviště

RRD musí být vysazeny na vhodné lokalitě, aby dosahovaly očekávaných vysokých výnosů. K základnímu posouzení půdních a klimatických podmínek slouží kód BPEJ (bonitovaná půdně ekonomická jednotka). Tento kód je sestaven na základě podrobného vyhodnocení vlastností klimatu, genetických vlastností půd, půdotvorných substrátů, zrnitosti půdy, obsahu skeletu, hloubky půdy, sklonitosti a expozice (Kohout *et al.*, 2010).

3.2.3.2 Sadební materiál

Nejčastěji se sázejí řízky nařezané z jednoletých, případně dvouletých výhonů, ne však starší. Řízek by měl mít minimální délku 20 cm a tloušťku 8 mm – tak je zajištěno, aby na řízku byly alespoň dva dobře vyvinuté pupeny. Řízky by neměly vykazovat příznaky vyschnutí, hniloby, nekrózy, poškození hmyzem nebo houbovými chorobami. Fyziologická kvalita řízků se zachovává při skladování v prostorách s trvale vysokou vzdušnou vlhkostí a teplotou do 4 °C (Čížková a Čížek, 2009).

3.2.3.3 Příprava půdy

Aby byly zajištěny ideální podmínky pro vzcházení a růst řízků RRD, je třeba začít s přípravou půdy obvykle rok dopředu. Provádí se celoplošná příprava půdy, která zahrnuje zejména odplevelení pozemku. Použití chemických přípravků pro velkoplošné odplevelování není vhodné z důvodů ochrany přírody a tvorby reziduí v půdě. Na zemědělské půdě je preferováno spíše mechanické odplevelování. Zaplevelené louky a pastviny je nutné opakovaně kosit či spásat (Celjak *et al.*, 2007).

3.2.3.4 Výsadba

Řízky se vysazují do dobře připravené půdy zapichováním téměř celou svou délkou kolmo do půdy. Nad povrchem půdy zůstává pouze první pupen. Půda musí být k řízku pevně přitlačena, aby se zabránilo vysychání. Po výsadbě se musí půda udržovat dostatečně vlhká a odplevelená (Čížková a Čížek, 2009).

3.2.3.5 Způsoby pěstování

Pěstování topolů ve velmi krátkém obmýtí 3 – 6 let

Z počátku je třeba připravit pozemek (mechanicky, příp. chemicky) tak, aby výsadba řízků byla provedena do čisté půdy. Sazenice se vysazují do poměrně hustého sponu, který musí odpovídat používané mechanizaci. Meziřádková vzdálenost je obvykle 1,3 – 2,5 m a vzdálenost rostlin v řádku bývá 0,3 – 0,5 m. Důležité je pravidelné plečkování do doby než se kulturní porost zapojí a bude tak schopen konkurovat plevelům. Dále se provádí ochrana proti škodám zvěří a monitoring škůdců. Velmi krátké, cyklické obmýtí se provádí po 3 – 6 letech. Obnova plantáže z výmladků na pařezu se uskutečňuje do věku kultury přibližně 20 let (Čížková a Čížek, 2009; Kohout *et al.*, 2010).

Pěstování topolů v krátkém obmýtí 20 – 25 let

Plantáže s krátkým obmýtím jsou pěstovány jako tzv. lignikultury. Jsou zakládány na stanovišti odpovídajícím nárokům dřeviny. Sazenice jsou vysazovány do předem připravené půdy v širokém sponu 6 × 6 m nebo 8 × 8 m. Od druhého roku se provádí vyvětřování kmene, které v dalších letech pokračuje do výšky 8 – 10 m. Celoplošná kultivace půdy se provádí až 10 let a díky tomu lze zvýšit přírůst až o 30 % (Čížková a Čížek, 2009; Kohout *et al.*, 2010).

3.2.3.6 Sklizeň

Jak již bylo řečeno, plantáže rychle rostoucích topolů se sklízí v tzv. velmi krátkém obmýtí, které se v našich podmínkách pohybuje mezi třemi až šesti roky. Pokud bude doba existence plantáže okolo 20 let, znamená to, že bude sklizena 4 – 8× (Havličková *et al.*, 2008; Celjak *et al.*, 2009).

Nejvhodnějším obdobím pro sklizeň jsou zimní měsíce (prosinec – březen). Je to z důvodu absence listové hmoty a celkově nižšího obsahu vody v dřevní hmotě a zároveň je možné využít volné pracovní síly a stroje. Vhodné je také sklízet, když je půda zmrzlá nebo suchá. Mechanizace tak nemá problémy s pohybem po pozemku (Havličková *et al.*, 2008; Celjak *et al.*, 2009).

V zásadě existují 2 technologie sklizně výmladkových plantáží:

- **Vícefázová sklizeň** – je to kombinace mechanizačních prostředků a manuální práce. Kmeny jsou po částečném vyschnutí na vzduchu (2 – 6 měsíců) štěpkovány. Štěpka je dostatečně suchá (30 %) i pro spalování v topeništích s nižším až středním výkonem.
- **Jednofázová sklizeň** – tento způsob většinou využívá samojízdné sklízecí stroje schopné výroby dřevní štěpky přímo na poli. Štěpka má vyšší vlhkost (50 %), ale je snadněji manipulovatelná a dopravovatelná. Pro spalování vlhké štěpky jsou vhodná velká topeniště nad 1MW (Havličková *et al.*, 2008).

3.2.3.7 Výnosový potenciál

Výnosový potenciál sušiny RRD nemůže být dopředu stanoven nikdy zcela přesně – vždy se bude jednat pouze o údaje teoretické. To proto, že při jejich zakládání, růstu a sklizni existuje mnoho proměnných faktorů: např. klimatické a půdní podmínky, vodní režim, svažitost a expozice pozemku, výběr vhodných dřevin v závislosti na lokalitě, způsob přípravy půdy před výsadbou, výběr a dodržení správné technologie výsadby, obsah živin,

způsob a rozsah ošetřování, délka obmýtí apod. Z toho lze logicky odvodit, že nejvyšší výnos bude na takové plantáži, na které se podaří optimalizovat výše uvedené faktory ovlivňující růst. Určitou roli hrají také faktory, které nelze ovlivnit, jako je např. průběh počasí (Kohout *et al.*, 2010).

3.2.4 Využití RRD

3.2.4.1 Energetické

Produktem výmladkových plantáží RRD je dřevní štěpka nebo palivové dříví (polena či krátké kusové dřevo). Výhřevnost počítaná na hmotnost závisí zejména na jeho vlhkosti, např. při absolutní sušině je $17,74 \text{ GJ}\cdot\text{t}^{-1}$. Čerstvě sklizená biomasa s vlhkostí 50 % má výhřevnost $7,65 \text{ GJ}\cdot\text{t}^{-1}$ (Havlíčková *et al.*, 2008).

Využití štěpky je především v lokálních teplárnách a výtopnách (do 50 km). Část produkce se také uplatňuje při spalování s uhlím v elektrárnách. Palivové dřevo a krátké kusové dřevo (6 – 7 cm) se uplatňují především při samozásobitelství palivem ve venkovských oblastech (Havlíčková *et al.*, 2008).

3.2.4.2 Neenergetické

Dřevo topolů je světlé, lehké, měkké a dobře se štípe. Z toho důvodu je využíváno na výrobu dých, překližek, sirek či obalového materiálu jako jsou bedny a přepravky. U nás se v současnosti využívá především v řezbářství a jako palivo. Z pupenů některých druhů se extrahuje olej pro farmaceutické účely (Havlíčková *et al.*, 2008).

3.2.5 Funkce RRD v krajině

Dřeviny pěstované pro potřeby cílené produkce energeticky využitelné biomasy je možné využít také ke zlepšení fungování krajiny, např. různých problémových lokalit na okrajích obcí, ale i v navazující volné krajině. Jde především o využití účinných vlastností dřevin a porostů pro zkvalitnění podmínek životního prostředí, ochrany přírody a tvorby krajiny (Jech *et al.*, 2003).

Plantáže RRD mají v krajině hned několik užitečných funkcí:

- **Biologická**
 - vznik biokoridorů a lesních společenstev v bezlesé zemědělské krajině
 - zvýšení biodiverzity zemědělské krajiny
 - úkryt a potrava pro hmyz, drobnou i vysokou zvěř, hnízdiště ptactva
- **Meliorační**
 - větrolamy – snižování větrné eroze a škod na zemědělských plodinách
 - biologická meliorace přemokřených stanovišť
 - zlepšení půdních poměrů
- **Izolační**
 - snížení prašnosti a hlučnosti
 - vytváření kořenových clon na ochranu vodních zdrojů
- **Asanační**
 - břehové porosty – rychlé zpevňování břehů proti vodní erozi
 - zlepšení tepelného režimu lokality
 - recyklace vody v krajině
 - zvýšení vlhkosti vzduchu
 - dekontaminace půd od těžkých kovů
- **Kulturní**
 - doprovod liniových staveb – aleje kolem cest a silnic
- **Estetická**
 - liniové hranice v krajině
 - rozčleňování krajiny
 - intravilány vesnic, u návesných rybníků, podél potoků
- **Naučná**
 - sbírky v odborných školách a institucích
- **Produkční**
 - plantáže topolů na energetické účely (Jech *et al.*, 2003).

3.2.6 Biodiverzita RRD

Biologická rozmanitost na plantážích energetických dřevin může působit jak pozitivně, tak i negativně. Mezi pozitivní jevy patří např. to, že plantáže mohou zvyšovat celkovou biodiverzitu v zemědělské krajině – mohou poskytovat úkryt některým savcům a ptákům či sloužit jako útočiště dravým a parazitickým druhům bezobratlých, zejména hmyzu vázanému na škůdce jiných zemědělských plodin. Na straně druhé mohou plantáže hostit i některé invazní druhy nebo druhy výhradně škodící na jiných zemědělských plodinách (Havlíčková *et al.*, 2008).

3.2.7 Choroby a škůdci RRD

3.2.7.1 Choroby

Odolnost proti chorobám je jednou z nejdůležitějších vlastností RRD. Choroby snižují výnosy rostlin nebo dokonce způsobují jejich smrt. Mohou také zhoršovat kvalitu výsledné suroviny (Kohout *et al.*, 2010).

Houbové choroby

Rzivost topolu (*Melampsora larici-populina*)

Rez je vůbec nejčastěji vyskytující se houbová choroba topolů. U citlivých klonů nebo při vysokém stupni napadení mohou rzi způsobovat předčasný opad pupenů a listů, a tím pádem významnou redukci biomasy. Dále způsobují vyšší náchylnost topolů k jiným chorobám, zvyšují pravděpodobnost mrazového poškození a zároveň jsou jednou z příčin odumírání mladých rostlin (Newcombe a Chastagner, 1993; Nienhaus *et al.*, 1998; Tomiczek *et al.*, 2005).

Během konce jara a začátku léta se na spodní straně listů objevují žlutooranžové kupky, které mohou pokrýt až celou listovou plochu. Vrchní strana listů je poseta drobnými žlutými skvrnkami, které postupně hnědnou a nekrotizují. Při silném napadení listy usychají a opadávají (Nienhaus *et al.*, 1998; Tomiczek *et al.*, 2005).

Rzi rodu *Melampsora*, potřebují k dokončení svého životního cyklu dva hostitele:

- topol – urediální a teliální stádium
- modřín – spermacie a aeciální stádium

Rez přezimuje ve formě zimních výtrusů tzv. teliospor na opadaném listí topolu. Na jaře z těchto výtrusů vyklíčí basidie, na kterých se tvoří basidiospory – ty se šíří pomocí větru a infikují nejbližší jehličnatý strom, nejčastěji modřín. Na jehlicích modřínu se o několik dní později vytváří aecie se žlutooranžovými aeciosporami na spodní straně listu a spermogonia se spermaciemi na vrchní straně listu. Napadení jehlic se projevuje chlorózou, nektrózou a nakonec úplným uschnutím jehlic. Ještě během jara jsou aeciospory rozšiřovány opět pomocí větru a infikují nejbližší porosty topolů. V průběhu léta se na listech topolu vytvářejí uredia, které mají za následek žluté skvrny na listech. Teplé a vlhké počasí v průběhu léta podporuje tvorbu uredospor (letní výtrusy). Napadené listy hnědnou a vadnou. V pozdním létě a na podzim se na opadaných listech začínají vytvářet černá dormantní stádia tzv. telia s teliosporami. Na jaře opět vyklíčí basidie s basidiosporami. Tím je životní cyklus rzi uzavřen (Chastagner, 2001; Kolařík *et al.*, 2005).

Hlavní prevencí proti napadení rzi je ochranné pásmo bez mezipřistětelů a výběr odolných klonů topolů. Přímá ochrana se provádí chemickým postřikem 2 – 3krát od objevení prvních uredií v 14denním intervalu (Malinová, 2006).

Listová skvrnitost (*Marssonina brunnea*, *M. populi*, *M. castegnei*)

Listová skvrnitost vyvolaná houbovým patogenem z rodu *Marssonina spp.* napadá mladé listy a nezdrěvnatělé výhony. Způsobuje škody ve formě předčasného opadu listů, redukci biomasy a odumírání rostlin (Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005; Malinová, 2006).

Během léta se na listech vytváří skvrnitosti typické pro jednotlivé druhy hub rodu *Marssonina*. Obecně se jedná o malé difúzní, oranžovohnědé skvrny se žlutým ohraničením, které se postupně zvětšují a zahušťují (Chastagner, 2001; Malinová, 2006).

- *Marssonina brunnea* f. sp. *trepidae* napadá topol osiku a topol osikový. Převážně na spodní straně listů jsou patrné hnědé 2 – 3 mm velké skvrny, postupně se připojují nektrózy.
- *Marssonina brunnea* f. sp. *brunnea* napadá topoly sekce *Aigeiros* (topol černý, topol euroamerický a topol bavlníkový). Na jaře se tvoří hnědé 1 – 2 mm velké tečky na obou stranách listů, okolní pletiva žloutnou, hnědnou až bronzovají.
- *Marssonina populi* nejvíce napadá topol černý, ale může se vyskytnout na všech druzích ze sekcí *Aigeiros* a *Tacamahaca*. Na listech se tvoří 4 – 5 mm velké okrouhlé skvrny s difúzním okrajem.

- *Marssonina castagnei* tvoří obvykle na horní straně listů topolu bílého 4 – 5 mm velké, nepravidelné skvrny ve středu šedé či bílé, které nejsou na okraji ostře ohraničené (Malinová, 2006).

Všechny druhy mají stejný životní cyklus. Patogen přezimuje jako stroma na opadaných listech a v lézích napadených větví. Na jaře acervuli začnou produkovat konidie, které se rozšiřují pomocí vody a způsobují primární infekci na nových listech. První příznaky se začnou projevovat po několika týdnech. Na listech se začnou utvářet plodnice, které produkují sekundární konidie. Ty v průběhu vlhkého počasí započínají druhý cyklus infekce, který trvá až do té doby, dokud nedojde k odlistění. V pozdním létě a brzy na podzim se na opadaných listech začínají tvořit opět stromata a tím je cyklus uzavřen (Ostry, 1987; Chastagner, 2001).

Ochrana spočívá v odstraňování napadených částí rostlin, vyvarování se přemokření a v pěstování odolných klonů (Chastagner, 2001).

Listová skvrnitost a odumírání konců letorostů (*Pollaccia elegans*, *P. radiosa*, *P. ramulosa*, *P. americana*)

Druh *P. elegans* (teleom.: *Venturia populina*) se dá považovat za nejzávažnější z rodu *Pollaccia* spp. (pohlavní stádium, *Venturia* spp.). Pro rozvoj infekce jsou vhodné vlhké podmínky. Obzvláště v mladých výsadbách může mít houba velmi ničující účinky (Malinová, 2006; Chastagner, 2001).

Brzy na jaře houba infikuje rašící listy a nově rostoucí letorosty. Způsobuje nepravidelné, tmavě ohraničené skvrny, obzvláště podél žilnatiny. Při silnějším rozvoji choroby listy odumírá a předčasně opadá, vrcholky letorostů krní a krouť se. I ostatní druhy této houby vyvolávají velmi podobné příznaky napadení (Malinová, 2006; Chastagner, 2001).

Houba přezimuje na napadených letorostech. Primární infekce se uskutečňuje na jaře, pomocí askospor rozšiřujících se větrem. Askospory vznikají v pseudotheciu. Během vegetační sezóny způsobují infekci také nepohlavní spory, konidie, vyskytující se na napadaných listech. Ochrana se provádí chemickým postřikem na nově narostlé letorosty (Chastagner, 2001).

Dotichíza topolová (*Chondroplea populea*, anam.: *Cryptrodiaporthe populea*)

Dotichíza je na území ČR velmi závažnou chorobou topolů. Běžně působí škody na stromech oslabených přesazením, suchem, mrazem, podmáčenou nebo neúrodnou půdou či na těch, které mají poškozené kmeny a kořeny. Způsobuje odumírání kůry na letorostech

i mladých kmenech a je nejnebezpečnější pro stromy do věku 6 let. Na starších stromech se projevuje prosycháním koruny (Sinclair a Lyon, 2005; Malinová, 2006).

Na napadených částech stromů (nejběžněji na kmeni a na bázích větviček) se na kůře objevují malé hnědé oválné a vodnaté skvrny, které se postupně rozšiřují v hnědé až černé léze. Mnoho infekcí může být zastaveno samotným hostitelem, a to i u citlivých jedinců. Obrana stromu spočívá v tvorbě tzv. hojivého závalu (obrost dřevem), který izoluje nekrotické léze. Mnoho menších infekcí tak může být zastaveno již v prvním vegetačním období po infekci. Při závažnějších infekcích napadené dřevo usychá, to vede k praskání a odlupování kůry, a tím dochází i k lámání větví (Nienhaus *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2001; Sinclair a Lyon, 2005; Malinová, 2006).

Patogen přezimuje ve formě mycelia a jako konidie, které se na konci roku vyvíjejí v uzavřených pyknidách. Infekci nejčastěji způsobují právě konidie, které pronikají přes pupeny na jaře, přes jizvy po opadu listů na podzim a skrze lenticely či různá poranění během celého roku. Po infekci kůry může zůstat patogen latentní až 2 roky, ale obvykle se léze objevují již při prvním období dormance. Ještě před dalším vegetačním obdobím mohou léze dosahovat až 30 cm. Na vzniku lézí se podílí toxin, který houba produkuje. Během několika týdnů po odumření částí větviček se v lézích tvoří pyknidy. Životní cyklus patogena se uzavírá novou produkcí konidií (Sinclair a Lyon, 2005).

Zdrojem nákazy je odpad po těžbě, přestárlé porosty nebo suché stromy ponechané v porostech. Šíření choroby podporuje zanedbávání včasného provádění probírek a těžby. K šíření nákazy dochází hlavně na podzim a na jaře, za podpory vlhkosti. V tuto dobu je také nutné provádět chemickou ochranu. Na jaře časujeme postřik 3 – 4 týdny před začátkem rašení. Na podzim aplikujeme postřik v první polovině října, a pokud není listí zcela opadané, opakujeme ošetření po opadu listí (Malinová, 2006).

Listová skvrnitost a korová nekróza topolu (*Mycosphaerella populorum*)

Tato houba, včetně svého nepohlavního stadia (anamorfy) *Septoria musiva*, je rozšířena v Severní a Jižní Americe, kde způsobuje listovou skvrnitost a korovou nekrózu četných druhů topolů, včetně hybridních i exotických druhů. Napadá stromy v různých věkových kategoriích (Newcombe *et al.*, 1995; Kapitola *et al.*, 2011).

Symptomy se značně liší v závislosti na hostiteli. U citlivých jedinců se projevují jako drobné černé skvrny na listech, které se postupně rozšiřují. Rozvoj infekce vede k nekrózám. Ty se projevují hnědým či bílým zbarvením s tmavým ohraničením. U částečně odolných

jedinců, skvrny zůstávají malé a mohou mít stříbřitý vzhled. Infekce převládá obzvláště na listech ve spodní části stromu (Chastagner, 2001).

Vznik korové nekrózy (rakovina) je spojen s vysokým výskytem listové skvrnitosti. Tvoří se obzvláště v místech poranění nebo přirozených otvorů. Z počátku se jedná o zvodnatělá pletiva, která postupně zčernají (Chastagner, 2001).

K infekci dochází na jaře askosporami (v pseudotheciích) i konidii (v pyknidách), rozšiřovanými větrem a vodou z opadaného listí, kde patogen přezimuje. Spory infikují nejprve mladé listy a později i kmínky. Vstupní branou pro infekci jsou různá poranění, ale i lenticely a jizvy po opadaných listech. Symptomy se objevují jeden až dva týdny po infekci. (Ostry, 1987; Kapitola *et al.*, 2011).

Patogen se šíří zejména transportem infikovaných sazenic, řízků i neodkorněného dřeva. Vzhledem k vysokému fyto-sanitárnímu riziku pro území EU, resp. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) je houba zařazena na seznamu karanténních ŠO ve směrnici Rady 2000/29/ES a vyhlášky 215/2008 Sb. a na seznamu EPPO A1. Základním opatřením uplatňovaným ve fyto-sanitárních předpisech EU je zákaz dovozu rostlin topolů, s výjimkou plodů a osiva, ze Severní Ameriky a zákaz dovozu samostatné kůry topolů z amerického kontinentu (Kapitola *et al.*, 2011).

Václavka obecná žlutoprstenná (*Armillaria mellea*)

Jedná se o dřevokaznou houbu, která patří mezi primární parazity. Ohroženy jsou především stresované porosty na nevhodných stanovištích (Malinová, 2006).

Ostatní dřevokazné houby infikují stromy především v místech poškození. Jejich význam stoupá hlavně s věkem hostitele. Mezi sekundární (ranové) parazity patří **ohňovec obecný** (*Phellinus igniarius*), **šupinovka zhoubná** (*Pholiota destruens*) nebo **sírovec žlutooranžový** (*Laetiporus sulphureus*). Ideální ochranou je zabránit poškození kmene. Pokud k němu ale dojde, je třeba takové místo okamžitě ošetřit (Malinová, 2006).

Bakteriízy

Korová nekróza (*Xanthomonas populi*)

Typickými příznaky jsou podélné praskliny na kmenu a větvích, které jsou obklopeny nepravidelnými valovitými okraji, z nichž na jaře vytéká bělavý lepkavý sliz. Nekróza kmene a větví zhoršuje kvalitu dřeva a nekróza obepínající výhony může vést k předčasnému odumření stromů (Malinová, 2006).

Nádorovitost a uzlovitost (*Agrobacterium tumefaciens*)

A. tumefaciens je půdní bakterie s velice širokým spektrem hostitelů. Pro napadené rostliny jsou typické hálky na kořenech a kmenech (nádory), proliferace kořenů a uzlovitost. Mladé rostliny s četnými hálkami bývají retardované v růstu, usychají a jsou náchylné na poškození mrazem. Velikost nádorů se pohybuje od několika milimetrů až po 30 cm a více. Jejich maximální velikost závisí především na kmenu patogena, na druhu a velikosti rostliny, a na rychlosti růstu infikované části (Sinclair a Lyon, 2005).

Infekce probíhá skrze poranění na kořenech, která vznikají snadno např. při vegetativním množení, přesazování či aktivitou půdních škůdců. Rostlinné buňky v oblasti poranění přitahují bakterie, které napadají jejich buněčné stěny. Bakterie přeměňují rostlinné buňky tak, aby vytvářely nadměrné množství rostlinných hormonů, konkrétně auxinů a cytokininů, které indukují tvorbu nádorů a zřejmě i bakterie vyživují (Sinclair a Lyon, 2005).

Odlupčivost kůry (*Erwina cancerogena*, *Pseudomonas syringae*)

Tyto druhy bakterií jsou považovány za původce hnědého mízotoku. Bakteriální infekce má fatální následky hlavně na mladé rostliny ve školkách (Chastagner, 2001; Malinová, 2006).

Nejviditelnější příznaky spojené s bakteriální infekcí jsou černé skvrny na listech, zčernalá žilnatina a řapíky. Odumírají také špičky letorostů. Odlupčivost kůry se poté projevuje na větvích a kmenech. Primární příznaky lze zaměnit s chorobou listové skvrnitosti a odumírání konců letorostů způsobené houbovým patogenem z rodu *Pollaccia* (Chastagner, 2001).

Mladé semenáčky stresované suchem, poškozené mrazem nebo mechanickým poraněním jsou náchylné k infekci. Bakterie přežívají na povrchu různých hostitelských rostlin. Odtud se rozšiřují pomocí větru, vody a hmyzu. K rozšiřování patogena přispívá také špatná hygiena pracovního nářadí nebo infikovaný množitelský materiál (Chastagner, 2001).

Virózy

Virus mozaiky topolu (*Poplar mosaic virus*, PopMV)

PopMV se řadí do rodu *Carlavirus* a je to nejvýznamnější virus vyskytující se na porostech topolů. Podrobněji je popsán v kapitole 3.3 Virus mozaiky topolu.

Virus mozaiky huseníku (*Arabid mosaic virus*, ArMV)

ArMV je ssRNA virus a řadí se do rodu *Nepovirus*, čeledi *Secoviridae*, řádu *Picornavirales*. Virové částice mají izometrický tvar a jsou asi 30 nm velké. Tento virus je rozšířený převážně v Evropě. Je přenášen vegetativním množením, semeny a pomocí vektorů, v půdě volně žijícími háďátky *Xiphinema diversicaudatum* a *X. coli* (Murant, 1970; Anonym 4, 2013).

Hostitelský okruh ArMV je poměrně široký. Vyskytuje se v mnoha druzích volně rostoucích i kulturních jednoděložných a dvouděložných rostlin (maliník, jahodník, salát, okurka, celer, rebarbora, cukrovka, chmel, réva vinná, zlatice, růže, narcis a další). Symptomy se objevují na listech jako listové deformace, mezižilní chloróza, nepravidelné žluté skvrny na listech a obecná chloróza, která je méně zřetelná v létě. Rostliny krní, výnosy jsou silně redukovány a rostliny hynou 1 až 2 roky po infekci (Murant, 1970; Šutić *et al.*, 1999).

Virus nekrózy tabáku (*Tobacco necrosis virus*, TNV)

Původně jeden druh TNV se nyní dělí na dva samostatné viry TNV-A řadící se do rodu *Alphanecrovirus* a TNV-D patřící do rodu *Betanecrovirus*. Oba dva viry patří do čeledi *Tombusviridae*, která je však jednou z mnoha skupin, které nespádají pod žádný řád. Je to RNA virus s izometrickým tvarem částic o velikosti 26 nm. Je rozšířen po celém světě. Přenáší se vegetativním množením, mechanickým poraněním a pomocí vektoru, konkrétně zoosporami půdní houby *Olpidium brassicae*, která napadá kořeny rostlin. Není přenosný semeny (Kassanis, 1970; Anonym 4, 2013).

TNV má široký hostitelský okruh jednoděložných i dvouděložných rostlin (brambor, fazol, okurka, réva vinná, hrušeň, tulipán a další). Obvykle způsobuje nekrotické léze, zřídka se projeví jako systémová infekce (Kassanis, 1970).

Virus nekrotické kadeřavosti tabáku (*Tobacco rattle virus*, TRV)

TRV je ssRNA virus řadící se do rodu *Tobravirus*, čeledi *Virgaviridae*, nespádající pod žádný řád. Virové částice jsou rovné, tubulární, s dvěma převládajícími délkami. Delší má 190 nm a kratší 50 – 115 nm, závisí na izolátu. Běžný izolát produkující virové částice, tzv. M-typ, má dva druhy genomové RNA, RNA-1 a RNA-2. Je přenášen vegetativním množením, inokulací pomocí infikované šťávy z nemocné rostliny a háďátkami z čeledi *Trichodoridae*. Izolát, který částice neprodukuje, se nazývá NM-typ, má pouze RNA-1. Přenos inokulací pomocí infikované šťávy je obtížný a pravděpodobně není přenosný ani

hád'átky. Virus se vyskytuje jen v některých částech světa, jako je Evropa, Japonsko, Nový Zéland či Severní Amerika (Robinson, 2003; Anonym 4, 2013).

TRV má široké hostitelské spektrum (brambor, cukrovka, špenát, salát, tulipán, mečík, hortenzie a další). Příznaky se projevují na listech jako mozaika, chlorotické a nekrotické skvrny, deformace. Nekrózy jsou patrné i na hlízách a cibulích rostlin (Robinson, 2003).

Virus kroužkovitosti tabáku (*Tobacco ringspot virus*, TRSV)

TRSV je ssRNA virus a řadí se do rodu *Nepovirus*, čeledi *Secoviridae*, řádu *Picornavirales*. Virové částice jsou izometrické a měří asi 28 nm. Přenáší se vegetativním množením, inokulací pomocí infikované šťávy, semeny a sadbou, a za pomoci hád'átka *Xiphinema americanum*. Vyskytuje se zejména v Severní Americe, ale šíří se do celého světa díky infikovanému množitelenskému materiálu (Stace-Smith, 1985; Anonym 4, 2013).

TRSV má široký hostitelský okruh zahrnující jak bylinné tak dřevité hostitele (sója, tykev, pelargonie, mečík, ostružina, borůvka, réva vinná, třešeň, jabloň a další). Příznaky jsou patrné na listech jako kroužkovité světlé skvrny, mozaika, chloróza, nekrotické léze (Stace-Smith, 1985).

Blíže nespecifikovaný virus ze skupiny Y virů bramboru (*Unidentified virus of potato virus Y group*, PVY)

PVY je ssRNA virus řadící se do rodu *Potyvirus*, čeledi *Potyviridae*, nespádající pod žádný řád. Viriony jsou vláknité, 730 – 740 nm dlouhé a 11 – 12 nm široké, s helikální symetrií. Virus je přenášen vegetativním množením, inokulací pomocí infikované šťávy a neperzistentně mšicemi. Je celosvětově rozšířený a je jedním z nejvíce hospodářsky významných patogenů (Kerlan, 2006; Anonym 4, 2013).

PVY má široký hostitelský okruh zahrnující zejména kulturní a okrasné rostliny z čeledi *Solanaceae* (brambor, tabák, rajče, paprika, petúnie), ale napadá i plevelné druhy, které do této čeledi nepatří. Příznaky se nejčastěji objevují na listech jako mozaika, skvrnitost, žilkovitost, žloutnutí, deformace a nekrózy. Rostliny jsou zakrslé a mají značně redukováné výnosy (Kerlan, 2006).

3.2.7.2 Škůdci

Mandelinka topolová (*Chrysomela populi*)

Tento brouk o velikosti 3 až 12 mm páchá na topolových plantážích asi největší škody. Mandelinka je cihlově červená s černozeleňým štítem. Konce krovek má černé. Na porostech se vyskytuje od dubna až do září. Celý vývoj mandelinky probíhá na topolu, takže škody tak způsobuje larva i dospělec. Larvy jsou až 15 mm velké, z počátku černé, později žlutobílé. Kuklí se na spodní straně listu. Do roka má mandelinka až 3 generace, které se mohou vzájemně prolínat (Kolařík *et al.*, 2005; Tomiczek *et al.*, 2005).

Poškození listů dírkovitým nebo štěrbinovitým žírem dospělců je patrné již na první pohled. Méně patrné je pak skeletování listů larvami. Při přemnožení dochází až k holožiru a tím k velkým ztrátám biomasy. Ochrana se provádí chemickým postřikem nebo sběrem brouků a odstraňováním napadených částí s larvami (Kolařík *et al.*, 2005; Tomiczek *et al.*, 2005).

Kozlíček topolový (*Saperda carcharias*)

Kozlíček je 20 – 30 mm velký, podlouhlý plstnatý šedavě žlutý tesařík s drobně, ale hustě černě tečkovanými krovkami. Jeho vývoj probíhá na topolech, kde se vyskytuje od června do srpna (Kolařík *et al.*, 2005).

Napadení larvami se projevuje hromádkami hrubých hnědožlutých třísek při kmenech a v otvoru, kterým je vyhazují z chodeb. Pro napadené části je charakteristické zduření. Brouci pak okusují mladou kůru 1 – 3letých výhonků a v listech vykusují okrouhlé otvory. Ochrana se provádí sběrem brouků, odstraněním napadených stromků, případně chemickým ošetřením, v období května až června, sousedních stromků (Kolařík *et al.*, 2005).

Drvopleň obecný (*Cossus cossus*)

Drvopleň je mohutný, tmavě šedohnědý motýl s kresbou křídel připomínající kůru. Rozpětí křídel je 6 – 9 cm. V porostech topolů se může vyskytovat od června do července. Na stromech škodí housenky, které jsou 10 cm velké, z vrchu masově červené a zespod žluté. Kuklí se v třískovém zámotku v zemi či v ústí chodby (Kolařík *et al.*, 2005).

Housenky ve dřevě kmenů vyžírají svislé, začernalé, až 1 m dlouhé chodby zapáchající po octovém kvašení. Spodním otvorem z chodeb vyhazují třísky a trus. Poškozené stromy se poznají podle kvasící šťávy při patě kmene. Ochrana se provádí odstraňováním a spalováním napadených stromů (Kolařík *et al.*, 2005).

Nesytky sršňová (*Sesia apiformis*)

Nesytky sršňová je naší největší nesytkou podobnou sršni, jak vyplývá z názvu. Rozpětí křídel je 4 cm. Oba páry jsou průhledné a bez šupinek. Tělo má žlutočerně pruhované. Vyskytuje se v období od května do srpna a její vývoj probíhá v topolech (Kolařík *et al.*, 2005).

Lysá žlutavá housenka vyžírá chodby v kořenech a bazích stromů. Ochrana se provádí odstraňováním a spalováním napadených částí stromů (Kolařík *et al.*, 2005).

Nesytky ovádová (*Paranthrene tabaniformis*)

Nesytky je menší motýl s předními křídly hnědými a zadními zcela průhlednými, v rozpětí asi 3,5 cm. Tělo i tykadla jsou černomodrá. Vyskytuje se v období od května do července. Má tříletý vývoj, který probíhá na topolech (Kolařík *et al.*, 2005).

Škodí lysé žlutobílé housenky, které vyžírají chodby v kořenech, větvích a mladých kmíncích, které poté často zduří. Ochrana se provádí odstraňováním a spalováním napadených částí stromů (Kolařík *et al.*, 2005).

Bourovec topolový (*Poecilocampa populi*)

Bourovec je tmavý huňatý motýl o rozpětí křídel 3 – 4,5 mm. Na tmavých šedohnědých předních křídlech má dvě úzké světlé příčky, zadní křídla má světlejší. Vyskytuje se od října do listopadu. Celý vývoj probíhá na topolu, kde škodí housenky (Kolařík *et al.*, 2005).

Housenky se vyskytují od května do července a škodí žírem listů. Ochrana se provádí sběrem housenek nebo chemickým postřikem (Kolařík *et al.*, 2005).

Saví hmyz

Méně viditelné škody způsobují i další druhy hmyzu. Ze zástupců bodavě savého hmyzu lze zmínit např. **mšice** a **křísi**, kteří jsou významní hlavně jako přenašeči virových chorob (Tomiczek *et al.*, 2005).

Poměrně významným zástupcem ze skupiny savého hmyzu je **dutilka topolová (*Pemphigus bursarius*)**. Dutilka je druh mšice, která vytváří hálky na řapících listů topolů. Mimo jiné sají na listech. Na jejích výměšcích medovice pak žijí černě (*Capnodium*), které svými povlaky omezují fotosyntézu rostlin (Kolařík *et al.*, 2005; Tomiczek *et al.*, 2005).

Zvěř

Na mladých plantážích způsobují škody srnci, kteří si o malé stromky vytloukají parůžky. Stromky, jejichž kůra je poškozená, zasychají. Větší škody pak může způsobit černá zvěř, především prase divoké. Prasata v porostu způsobují významné mechanické poškození či úplné vyrytí kořenů stromku z půdy. Méně často se mohou objevit zajíci, kteří škodí okusem sazenic (Kohout *et al.*, 2010).

3.3 Virus mozaiky topolu

3.3.1 Taxonomické zařazení PopMV

Virus mozaiky topolu (*Poplar mosaic virus*, PopMV) se řadí do rodu *Carlavirus*, čeledi *Betaflexiviridae*, řádu *Tymovirales*. Do rodu *Carlavirus* je v současné době zařazeno 52 druhů rostlinných virů. Tato skupina byla pojmenována podle kmenového zástupce *Carnation latent virus*, latentního viru karafiátu. Někteří zástupci tohoto rodu byli nalezeni v dřevinách, mezi tuto skupinu se řadí právě PopMV (Atkinson a Cooper, 1976; Cooper *et al.*, 1986; Sinclair a Lyon, 2005; Anonym 4, 2013).

Viriony jsou mírně vláknité, 610 – 700 nm dlouhé a 12 – 15 nm široké. Mají helikální symetrii. Každá virová částice obsahuje jednu molekulu lineární ssRNA (jednořetězcová ribonukleová kyselina) o velikosti 7,4 – 7,7 kb (Atkinson a Cooper, 1976; Cooper *et al.*, 1986; Sinclair a Lyon, 2005; Anonym 4, 2013).

Viry z rodu *Carlavirus* jsou přenosné pomocí hmyzu, nejčastěji mšicemi a nejméně dvěma druhy molic, a to neperzistentně a semiperzistentně. Většina těchto virů je přenosná mechanicky a to inokulací rostlin pomocí infikované šťávy z nemocné rostliny. Kontaktem mezi dvěma rostlinami už tak snadno přenosné nejsou. Přenos semený či pylem nebyl do dnešní doby prokázán (Sinclair a Lyon, 2005; Anonym 4, 2013).

3.3.2 Obecná charakteristika

Virus mozaiky topolu byl poprvé popsán v roce 1935 v Bulharsku na *P. balsamifera*. Později byla jeho přítomnost popsána v různých lokalitách rozptýlených po celém světě (Evropa, Kanada, USA, Japonsko), kromě Jižní Ameriky. K celosvětovému šíření toho viru přispěla intenzivní mezinárodní a mezikontinentální výměna množitelského materiálu topolů, tedy do dnešní doby jediného popsaného hostitele tohoto patogena. Rozšíření viru

a skutečnost, že v přírodě napadá pouze topoly, ovlivnilo téměř všechny komerčně pěstované kultivary evropsko-amerických kříženců topolů, jako jsou *P. balsamifera* a jeho poddruh *trichocarpa*, *P. deltoides*, *P. nigra*, *P. tremula* a *P. tremuloides*, které se našly v Evropě napadené právě tímto typem viru (Atanasoff, 1935; Navratil, 1979; Cooper a Edwards, 1981; Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005).

Virová částice PopMV je vláknitá o velikosti 675–685 × 15 nm. Virus dosahuje nejvyšší koncentrace v symptomatických listech, ale pomocí sérologických metod může být detekován i z listů bez symptomů z té samé rostliny (Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005).

3.3.3 Symptomatologie PopMV

Výška růstu napadených rostlin může být potlačena od 0 do 50 %. To závisí především na stáří stromu, na citlivosti pěstovaného kultivaru, na příslušném kmenu PopMV nebo na pěstebních podmínkách. Pokud je rostlina příliš citlivá, může docházet k odumírání letorostů. Tyto závažné příznaky jsou však zaznamenávány pouze u mladých rostlin, u kterých po několika letech uplynulých od infekce odeznívají. Naopak u tolerantních klonů probíhá infekce bez omezení v růstu. Také starší rostliny jsou více odolné (Navratil, 1979; Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005).

První příznaky na listech se obvykle objevují na konci jara, na prvních plně rozvinutých listech, avšak během léta mohou zmizet. Napadené listy jsou typické difuzními chlorotickými skvrnami, mozaikou a především prosvětlenou žilnatinou (Obr. 1). Napadení se dále může projevovat začervenalou či nekrotickou žilnatinou a nekrotickými lézemi v okolí řapíku a hlavní žilnatiny. Listy s takovými příznaky napadení vykazují známky abnormálního vývoje, tedy mají tendenci být deformované, křehké a předčasně opadávají. Vysoká teplota může způsobit tzv. maskování příznaků napadených listů. Jsou napadány parenchymatické i floémové tkáně což vede k systémové virové infekci. Nemocné stromy jsou typické zpomalením fotosyntézy a naopak zvýšením rychlosti respirace. Také se objevují jisté odchylky od běžného transportu vody v rostlině a změny v obsahu cukrů a chlorofylu v listech. Specifická hmotnost a pevnost dřeva napadených stromů je jen nepatrně ovlivněna (Biddle a Tinsley, 1971b; Navratil, 1979; Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005).

Obrázek 1: Listy topolů napadené virem mozaiky topolu (vlastní fotografie).



3.3.4 Přenos PopMV

PopMV je přenosný vegetativním množením, kontaktem mezi kořeny rostlin a inokulací infikovanou šťávou. Pokud virus napadne rostlinného hostitele, je v něm už natrvalo (Navratil, 1979; Cooper, 1981; Sinclair a Lyon, 2005).

Dosud není znám přenos pomocí vektorů či jiným způsobem, jako je přenos semeny nebo pylem (Cooper, 1981; Sinclair a Lyon, 2005).

3.3.5 Vybrané diagnostické metody pro detekci PopMV

3.3.5.1 Diagnostika rostlinných virů dle příznaků

Rostlinné viry obvykle způsobují významné a charakteristické změny na celých rostlinách či jen na jejich částech. Výsledkem je poté např. změna v pigmentaci (mozaiky, pestrokvětost, žloutnutí), redukce růstu (zakrnělost), nekróza či deformace. Pozorování příznaků na celé rostlině a analýza okolností jejich vzniku a vývoje patří mezi první kroky diagnostiky (Astier *et al.*, 2007).

3.3.5.2 Diagnostika rostlinných virů dle jejich biologických vlastností

Práce s viry je znesnadňována skutečností, že tyto fytopatogenní organismy nedokáží přežít mimo rostlinného hostitele. Proto je snaha o zajištění snadno dostupného alternativního zdroje virového materiálu. Právě za tímto účelem se pěstují tzv. indikátorové rostliny, které se využívají jako virové rezervoáry. Tím je umožněn celoroční přísun čerstvého virového materiálu, který lze podrobovat dalším analýzám. Jako indikátorové rostliny pro PopMV se nejčastěji používají druhy rodu *Nicotiana* (*N. megalosiphon*, *N. glutinosa*), dále pak např. *Lavatera trimestris* či *Vigna sinensis*. Tyto rostliny se inokulují šťávou z infikovaných rozdrcených listů topolu. Především rostliny druhu *Nicotiana megalosiphon* byly shledány jako vůbec nejcitlivější i vůči nízkým koncentracím viru (Biddle a Tinsley, 1971a; Cooper *et al.*, 1986; Chastagner, 2001; Sinclair a Lyon, 2005).

3.3.5.3 Diagnostika rostlinných virů pomocí sérologických metod

Nejpoužívanější imunologickou technikou v rostlinné virologii je metoda ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay). Je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, která bývá značená enzymem (nejčastěji alkalickou fosfatázou). Jedna z těchto dvou složek je vždy navázána na pevný nosič (např. na povrch mikrotitrační destičky). Detekce viru je pak provedena na základě enzymové reakce, což způsobí barevnou změnu substrátu (Regenmortel, 2006; Astier *et al.*, 2007).

Nejčastěji užívanou metodou z řad ELISA-testů je DAS-ELISA (Double antibody sandwich). Skládá se z několika kroků. Nejdříve je na pevnou fázi imobilizována protilátka, poté je přidán antigen, který reaguje s již navázanou protilátkou. Nakonec se aplikuje protilátka s navázaným enzymem. Jednotlivé kroky jsou odděleny vždy odstraněním nenavázaných složek (promytím). Aktivita alkalické fosfatázy se projevuje změnou bezbarvého substrátu na žlutý. Intenzita zbarvení se měří pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm (Clark a Adams, 1977; Astier *et al.*, 2007).

3.3.5.4 Diagnostika rostlinných virů pomocí molekulárně genetických metod

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je založena na principu replikace nukleové kyseliny v *in vitro* podmínkách. Jedná se o cyklicky se opakující enzymovou syntézu nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Výsledkem PCR je pak mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA. Pro úspěšný průběh reakce je nutné znát sekvence v bezprostředním sousedství úseku DNA,

který chceme pomnožit (vlastní sekvence tohoto úseku však známá být nemusí) (Astier *et al.*, 2007; Morales, 2006).

Vlastní reakce pak probíhá v tzv. termocykleru, kde se automaticky střídá několik cyklů – první cyklus: denaturace (94 °C), reasociace neboli připojení primerů (30 – 65 °C) a elongace čili syntéza nové DNA (65 – 75 °C). Následující cykly jsou analogické cyklu prvnímu, s tím, že se reakce 25 – 35 krát opakuje. PCR reakce je přinejmenším stokrát citlivější, než většina sérologických metod, což ji řadí k nejvíce úspěšným metodám pro detekování virů při velmi nízkých koncentracích (Astier *et al.*, 2007; Morales, 2006).

Jelikož molekula RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR (pracuje pouze s DNA), nebylo by možné touto metodou detekovat většinu rostlinných virů. Proto je potřeba RNA převést na cDNA retrovirovou zpětnou transkriptázou. Tato metoda se nazývá reverzní transkripce – PCR (RT-PCR) (Astier *et al.*, 2007; Morales, 2006).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Detekce PopMV v rostlinném materiálu

4.1.1 Rostlinný materiál

Za účelem monitoringu viru mozaiky topolu ve vybraných lokalitách České republiky bylo otestováno celkem 220 stromů topolů. V průběhu roku 2014 byly uskutečněny výjezdy do jedenácti lokalit, situovaných v oblastech Středních, Jižních, Západních Čech a Vysočiny. Konkrétně se jednalo o:

- Kačice, Slaný, Buchov, Zdebuzevy, Šternov (Středočeský kraj)
- Slapy, Větrovy (Jihočeský kraj)
- Přáslavice, Čáslavsko, Kámen (Kraj Vysočina)
- Březno (Západočeský kraj)

Další vzorky (celkem 10) byly odebrány z volně rostoucích topolů (aleje, stromořadí) a to z oblasti Kozí hřbety u Suchdola.

Standardní vzorek představoval biologický materiál v podobě listů rovnoměrně odebraných z rostlin topolu po celém obvodu koruny. Vzorky použité pro jednotlivé analýzy byly zpracovány buď přímo v čerstvém stavu, nebo jako chlazené (uskladněny v lednici +/- jeden týden) či zamražené (uskladněné v mrazicím boxu při -24 °C).

Vzorky topolů byly následně podrobeny analýze na přítomnost PopMV pomocí sérologické metody DAS-ELISA a dále pomocí molekulárně genetické metody reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Detekce PopMV byla v některých případech realizována pomocí přenosu patogena na indikátorové rostliny. Jednotlivé detekční techniky jsou podrobně popsány v následujících kapitolách.

4.1.2 Detekce PopMV pomocí sérologické metody DAS-ELISA

Sérologické testy byly provedeny pomocí techniky DAS-ELISA (Clark a Adams, 1977; Clark a Bar, 1984). Polyklonální protilátky byly komerčně připraveny firmou DSMZ.

1. Povrch jamek mikrotitrační destičky byl nejprve potažen 100 μ l potahovacího pufru se specifickou polyklonální protilátkou (zásobní roztok IgG byl ředěn potahovacím pufrům dle návodu výrobce). Destička byla zabalena do mokré gázy

- a igelitového sáčku a následně byla inkubována 2 hod při 37 °C nebo při 4 °C přes noc.
- 100 mg vzorku testovaných rostlin bylo homogenizováno spolu s extrakčním pufrem v poměru 1:10.
 - Po inkubaci byly jamky třikrát, po dobu 3 min, promyty promývacím pufrem. Do jednotlivých jamek bylo převedeno 100 µl homogenátu (každý vzorek dvakrát). Do předem vyznačených jamek byl napipetován pouze extrakční pufr (slepá kontrola), homogenát z viruprostých rostlin (negativní kontrola) a extrakt z rostlin napadených PopMV (pozitivní kontrola).
 - Následně byla mikrotitrační destička ponechána ve 4 °C přes noc. Následující den byly z jamek vzorky odsáty pomocí odsávačky a jamky byly opět třikrát, po dobu 3 min, promyty promývacím pufrem.
 - Do jamek bylo přidáno 100 µl extrakčního pufru s polyklonální protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP byl ředěný dle návodu výrobce). Destičky byly inkubovány 2 hod při 37 °C.
 - Poté byly destičky čtyřikrát, po dobu 3 min, promyty promývacím pufrem a do jamek bylo převedeno 100 µl substrátového pufru se substrátem (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate; 1 mg/ml). Následovala inkubace vzorků při laboratorní teplotě bez přístupu světla.
 - Po 2 hod byla vyhodnocena barevná reakce alkalické fosfatázy se substrátem při 405 nm pomocí spektrofotometru Tecan SunriseTM a pomocí programu MagellanTM Data analysis software (Tecan).

Složení pufrů a roztoků

- **10× PBS (pH 7,4).** 80 g NaCl; 2 g KH₂PO₄; 11,5 g Na₂HPO₄; 2 g KCl; (2 g NaN₃) doplníme sterilní ddH₂O do 1 000 ml. Skladujeme v tmavé láhvi při 4 °C.
- **Extrakční pufr.** 2% PVP (w/V); 0,2% BSA (w/V); 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v 1 000 ml 1× PBS pufru. Skladujeme při 4 °C jeden den.
- **Promývací pufr.** 0,5 ml Tween 20 rozpustíme v 1 000 ml 1× PBS. Skladujeme při 4 °C.
- **Potahovací pufr (pH 9,6).** 1,59 g Na₂CO₃; 2,93 g NaHCO₃; (0,2 g NaN₃) rozpustíme v 1 000 ml sterilní ddH₂O. Skladujeme při 4 °C.

- **Substrátový pufr (pH 9,8).** 97 ml diethanolamin (0,2 g NaN₃); 0,095 g MgCl₂ rozpustíme v 1 000 ml sterilní ddH₂O. Skladujeme v tmavé láhvi při 4 °C.

4.1.3 Detekce PopMV pomocí metody RT-PCR

4.1.3.1 Izolace celkové RNA „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001)

1. 100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu bylo převedeno do třecí misky a pomocí tekutého dusíku rozdrceno na drobný prášek.
2. Po odpaření dusíku bylo přidáno 1000 µl grinding pufru (těsně před použitím byl k pufru přidán 2% metabisulfát sodný) a homogenát byl převeden do mikrozkuhavky.
3. Po centrifugaci (6 000 × RPM, 3 min, 4 °C) bylo do nové mikrozkuhavky převedeno 500 µl supernatantu (vodní fáze) a spolu se 100 µl 10% N-lauronyl-sarkosinu byl vzorek inkubován 10 min při teplotě 70 °C. V průběhu inkubace byla mikrozkuhavka každé 3 min promíchávána na dotykové třepačce.
4. Následovala inkubace na ledu 5 min a centrifugace (13 000 × RPM, 10 min, 4 °C).
5. Do nové mikrozkuhavky bylo převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku bylo přidáno 300 µl roztoku 6M jodidu sodného, 150 µl chlazeného absolutního etanolu a 30 µl silika suspenze.
6. Následovala inkubace při laboratorní teplotě 10 min. Vzorek byl po celou dobu promícháván na třepačce v horizontální poloze (600 RPM).
7. Po centrifugaci (6 000× RPM, 1 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta (pevná fáze) promyta 500 µl promývacího pufru. Tento krok byl jednou zopakován.
8. Po odstranění supernatantu byla mikrozkuhavka ponechána při laboratorní teplotě na pracovní desce 10 min k sušení. Peleta byla resuspendována ve 150 µl sterilní ddH₂O. Následovala inkubace 4 min při 70 °C a centrifugace (13 000 × RPM, 3 min, 4 °C).
9. 120 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozkuhavky a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-24 °C) či byl ihned použit pro další analýzy.

Potřebné chemikálie

- **Grinding pufr (pH 5,6).** 4 M guanidin thiokyanát; 0,2 M octan sodný; 1 M octan draselný; 25 mM EDTA; 2,5% PVP (w/v). Uchováváme při 4 °C.

- **Jodid sodný.** 0,75 g Na₂SO₃; 6 M NaI. Příprava: 0,75 g Na₂SO₃ rozpustíme ve 40 ml sterilní ddH₂O a přidáme 36 g NaI. Uchováváme v tmavé láhvi při 4 °C.
- **Promývací pufr (pH 7,5).** 10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaCl. Sterilizujeme pomocí autoklávu. Poté přidáme absolutní etanol (50% objemu). Uchováváme při 4 °C.
- **Silika suspenze (pH 2,0).** Příprava: Ve 250 ml sterilní ddH₂O rozpustíme 30 g silika částic, směs promícháme a necháme do druhého dne sedimentovat. Následující den odstraníme horní fázi (přibližně 235 ml), zbylou část roztoku doplníme vodou do 250 ml, roztok promícháme a ponecháme 5 hod sedimentovat. Odsipetujeme 220 ml horní fáze, zbylý roztok důkladně homogenizujeme. Sterilizujeme pomocí autoklávu, uchováváme v tmavé láhvi při 4 °C.

4.1.3.2 Metoda Two-Step RT-PCR

Reverzní transkripce

1. Syntéza cDNA probíhala v reakčním objemu 50 µl. Nejprve byl připraven premix o objemu 30 µl obsahující:
 - X µl sterilní ddH₂O
 - 0,5 µl náhodných primerů (zásobní roztok 1 µg/ µl; finální koncentrace 0,5 µg; Roche)
 - přibližně 750 ng celkové RNA
2. Vzorek byl 5 min inkubován ve 100 °C a poté nechán 2 min na ledu.
3. K premixu bylo následně přidáno:
 - 10 µl 5× *First Strand Buffer* (finální koncentrace 1×; Invitrogen)
 - 4,8 µl sterilní ddH₂O
 - 2,5 µl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,5 mM; Fermentas)
 - 2,0 µl DTT (zásobní roztok 0,1 mM; finální koncentrace 4mM; Invitrogen)
 - 0,7 µl Mu-MLV reverzní transkriptázy (zásobní roztok 200 U/µl; finální koncentrace 40 U, Invitrogen).
4. Mikrozkušavka byla ponechána ve 42 °C po dobu 55 min a poté byla 10 min inkubována v 70 °C.

Polymerázová řetězová reakce

1. Reakce PCR byla prováděna v objemu 25 μl obsahujícím:
 - 18,05 μl ddH₂O
 - 2,5 μl 10 \times *DreamTaq buffer* (finální koncentrace 1 \times ; Fermentas)
 - 0,25 μl každého dNTP (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,1 mM; Fermentas)
 - 0,5 μl reverzního primeru PopMVCP1r/Popr2 (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM)
 - 0,5 μl forwardového primeru PopMVCP1f/Popf2 (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM)
 - 0,2 μl *DreamTaq* polymerázy (zásobní roztok 5 U/ μl ; finální koncentrace 1 U, Fermentas).
 - 3 μl cDNA vzorku
2. Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Podrobné informace o použitých primerech a podmínky během amplifikace jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité primery, programy PCR a velikosti fragmentů produktů PCR.

Primery	PopMVCP1f (Naylor <i>et al.</i> , 2004)
	PopMVCP1r (Naylor <i>et al.</i> , 2004)
Sekvence (5'-3')	TGAGTGGGGAACAAACTGAAC
	GAGTCAAAGTCCACATAACTTTTG
Program	94 °C 3 min; 35 cyklů: 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s; 72 °C 5 min
Velikost fragmentu	505 bp
<hr/>	
Primery	PopMV-LF1 (diplomová práce)
	PopMV-LR1 (diplomová práce)
Sekvence (5'-3')	AGCTGTGCCTTAGGTTATAGG
	GTTAACCATTGTCACACTTGC
Program	94 °C 2 min; 35 cyklů: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 45 s; 68 °C 10 min
Velikost fragmentu	1007 bp
<hr/>	
Primery	PopMV-LF2 (diplomová práce)
	PopMV-LR2 (diplomová práce)
Sekvence (5'-3')	TTAGCTGTGCCTTAGGTTATAGG
	AAGAACCCTTCCTCATGTTAACC
Program	94 °C 2 min; 35 cyklů: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 45 s; 68 °C 10 min
Velikost fragmentu	995 bp

Tabulka 2: Použité primery, programy a velikosti fragmentů produktů PCR – pokračování.

Primery	Popf2 (diplomová práce)
	Popr2 (diplomová práce)
Sekvence (5'-3')	CTATGGAAAGTGAAACTGAGC
	CCAACATGTAATTCCACACG
Program	94 °C 2 min; 35 cyklů: 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s; 72 °C 10 min
Velikost fragmentu	386 bp

4.1.3.3 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Pro vizualizaci výsledků byla použita elektroforetická separace nukleových kyselin pomocí horizontální agarózové elektroforézy.

1. Příprava 1% agarózového gelu

- Navážený 1 g agarózy byl kvantitativně převeden do baňky, kde byl smíchán spolu s 1× TBE pufrem na konečný objem 100 ml. Následně byla baňka zahřívána v mikrovlnné troubě, po dobu asi 3 min, což způsobilo rozpuštění agarózy. Roztok byl poté ochlazen proudem studené vody na zhruba 60 °C. Po ochlazení bylo přidáno 50 µl ethidium bromidu (konečná koncentrace 0,5 µg/ml) a roztok byl promíchán. Gel byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem tak, aby nevznikly bubliny a nechal se zatuhnout.

2. Pipetování DNA vzorků do gelu

- Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforézní vaničky tak, aby byl celý ponořený v 1× TBE pufriu. Po vytažení hřebínku v gelu vznikly mezery, do kterých bylo následně napipetováno 10 µl PCR produktu smíchaného s 2 µl barviva *DNA Loading Dye* (Fermentas). Do první a poslední mezery byly vždy napipetovány 2 µl hmotnostního standardu *Low-Range DNA Ladder* (Fermentas).

3. Elektroforetická separace nukleových kyselin

- Elektroforéza probíhala za konstantního stejnosměrného napětí 90 – 120 V po dobu 45 min (4-6 V/cm).

4. Vizualizace DNA fragmentů

- Po skončení elektroforézy následovala vizualizace DNA fragmentů pod UV transiluminátorem. Pomocí hmotnostního standardu byla určena velikost fragmentů nukleové kyseliny. Výsledné elektroforeogramy byly

zdokumentovány automatickým dokumentačním a analytickým *Bio Imaging* systémem *InGenius* (Syngene).

Potřebné chemikálie:

- **10× TBE (pH 8,0).** 890 mM Tris-HCl; 890 mM kyselina boritá; 20 mM EDTA. Sterilizujeme pomocí autoklávu. Skladujeme při laboratorní teplotě.

4.1.4 Detekce PopMV pomocí indikátorových rostlin

Rostliny tabáku *Nicotiana megalosiphon* byly inokulovány šťávou získanou buď z čerstvých listů rostlin infikovaných virem (z listů tabáků či listů topolů) anebo šťávou z lyofilizovaných listů tabáku infikovaných PopMV.

Podrobný postup byl následující:

- 2 g čerstvých listů se rozdrtily ve třecí misce spolu s 0,05 M fosfátovým pufrům (pH 7,5) s 0,02 M síranem sodným.
- 0,5 g lyofilizovaného rostlinného materiálu se smíchalo s 0,05 M fosfátovým pufrům (pH 7,5) s 0,02 M síranem sodným.

Povrch listů tabáků se poprášil karborundem a za pomoci prstů v rukavicích byla provedena mechanická inokulace infikovanou šťávou. Díky tření se na povrchu listů tvořila jemná mechanická poranění, pomocí kterých mohl virus prostoupit do rostlin. Po inokulaci se listy rostlin opláchly proudem tekoucí vody.

Rostliny byly následně ponechány ve skleníku, tedy v izolovaném prostředí, které bylo příznivé pro propagaci viru (dostatečná intenzita osvětlení a teplota okolo 20 – 25 °C).

4.2 Analýza genetické variability izolátů PopMV

4.2.1 Rostlinný materiál

Jako výchozí biologický materiál bylo použito několik různých izolátů viru mozaiky topolu, jmenovitě dva izoláty získané z volně rostoucích rostlin topolu na území Kozích hřbetů v lokalitě Suchdol (*Populus nigra* L.), dále dva izoláty PopMV získané z rostlin topolů rostoucí v Západočeském kraji na území Českého středohoří (*Populus nigra* L.) a poslední dva izoláty viru získané z topolů rostoucích ve sbírce Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví (VÚKOZ) v Průhoncích (*Populus nigra* L. pocházející

z Velkého Biela ze Slovenska a *Populus × canadensis* Moench 'NL-B-132b' pocházející z Uherského Hradiště). Všechny analyzované rostliny byly na základě předešlých ELISA testů označeny jako pozitivní na přítomnost PopMV.

4.2.2 Příprava vzorků pro sekvenci

4.2.2.1 Izolace celkové RNA

Izolace celkové RNA byla uskutečněna pomocí „silika“ metody dle Rott a Jelkmann (2001). Celý postup je podrobně popsán v kapitole 4.1.3.1.

4.2.2.2 RT-PCR

Postup pro reverzní transkripci je popsán v kapitole 4.1.3.2.

Polymerázová řetězová reakce

1. Reakce PCR byla prováděna v objemu 25 µl obsahujícím:
 - 15,08 µl ddH₂O
 - 2,5 µl 10× *High Fidelity PCR Buffer* (finální koncentrace 1×; Invitrogen)
 - 1 µl MgSO₄ (finální koncentrace 50 mM; Invitrogen)
 - 0,5 µl každého dNTP (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,1 mM; Fermentas)
 - 1 µl reverzního primeru LR1/LR2 (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,2 µM)
 - 1 µl forwardového primeru LR1/LR2 (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,2 µM)
 - 0,2 µl *Platinum Taq DNA* polymerázy *High Fidelity* (zásobní roztok 5 U/µl; finální koncentrace 1 U, Invitrogen).
 - 3 µl cDNA vzorku
2. Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Podmínky během amplifikace jsou uvedeny v tabulce 2.

4.2.2.3 Elektroforetická separace

Separace nukleových kyselin proběhla pomocí gelové elektroforézy. Postup je podrobně popsán v kapitole 4.1.3.3.

4.2.2.4 Klonování pomocí vektorového plasmidu

Příprava vzorku

Purifikace PCR produktu byla provedena pomocí komerčního kitu *QIAquick gel extraction kit MiniElute* (Qiagen). Uvedený postup byl doporučen samotným výrobcem.

1. Po skončení elektroforézy byl PCR produkt vizualizován pomocí UV transiluminátoru a pomocí ostrého a sterilního skalpelu byl vyříznut z gelu.
2. Vyřízlá část gelu byla umístěna do mikrozkuhavky a zvážena. Poté byl ke vzorku přidán *Buffer QG* o 3 objemech hmotnosti vyříznutého gelového nosiče (tedy 300 μ l *Buffer QG* na 100 mg gelu).
3. Vzniklá suspenze byla ponechána v 50 °C po dobu 10 min. Během této doby byla každé 2 – 3 min mikrozkuhavka ručně promíchávána, aby došlo k dokonalému rozpuštění gelu.
4. Poté byl ke vzorku přidán isopropanol ve stejném množství, jako byla hmotnost gelového nosiče (tedy 100 μ l isopropanolu na 100 mg gelu). Mikrokumavka byla opět promíchána.
5. Suspenze byla převedena do nové mikrozkuhavky, kde byla umístěna kolonka s membránou. Poté následovala centrifugace (10 000 \times g, 1 min, 21 °C).
6. Poté byla vodní fáze odstraněna a do kolonky bylo přidáno 500 μ l *Buffer QG*. Následovala centrifugace (10 000 \times g, 1 min, 21 °C).
7. Opět byla odstraněna vodní fáze a bylo přidáno 750 μ l *Buffer PE*. Následovala centrifugace (10 000 \times g, 1 min, 21 °C).
8. Naposledy byla odstraněna vodní fáze a následovala centrifugace „na sucho“ (10 000 \times g, 1 min, 21 °C).
9. Po centrifugaci byla kolonka umístěna do nové čisté mikrozkuhavky.
10. Pro uvolnění DNA z kolonky bylo přesně na střed membrány napipetováno 10 μ l *Buffer EB*. Mikrozkuhavka byla inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě a poté proběhla centrifugace (10 000 \times g, 1 min, 21 °C).

11. Suspenze prošlá skrz kolonku byla opět nanesena na střed membrány, mikrozkuhavka byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě a poté proběhla konečná centrifugace ($10\,000 \times g$, 1 min, 21 °C).

Purifikovaný vzorek DNA byl uskladněn v mrazicím boxu (-24 °C) nebo byl ihned podroben dalším analýzám.

Ligace PCR produktu pomocí *StrataClone PCR Cloning Kit*

Pro ligaci PCR fragmentů do plazmidových vektorů a jejich následnou transformaci do bakteriálních buněk byl použit komerční kit *StrataClone PCR Cloning Kit* (Agilent Technologies, USA). Uvedený postup byl doporučen samotným výrobcem.

1. Příprava legační směsi:

Ligační směs o objemu 3 μ l obsahovala:

- 1,5 μ l *StrataClone Cloning Buffer*
- 1 μ l PCR produktu
- 0,5 μ l *StrataClone Vector Mix*

Ligační směs byla promíchána pipetou a následovala inkubace 20 min při laboratorní teplotě. Poté byla umístěna na led.

2. Během inkubace byly na led umístěny kompetentní bakteriální buňky *StrataClone SoloPack* v objemu 25 μ l.
3. Ligační směs byla převedena do mikrozkuhavky s bakteriálními buňkami. Následně byla inkubována na ledu po dobu 30 min.
4. Poté byla umístěna do 42 °C na 45 s a následně byla prudce zchlazena na ledu po dobu 2 min.
5. Ke vzorku bylo přidáno 250 μ l LB media, zahřátého na 42 °C a v horizontální poloze byl kontinuálně promícháván (600 RPM) ve 37 °C po dobu 1 hod.
6. Nakonec bylo 100 μ l vzorku převedeno na LB agaróзовé misky s ampicilinem (100 μ g/ml), na které bylo s 30 min předstihem naneseno 40 μ l 2% X-galu.
7. Takto připravené misky byly inkubovány 12 hod ve 37 °C.

Potřebné chemikálie

- **Roztok LB media** (pH 7). 20 g LB media rozpustíme v 1 l H₂O. Sterilizujeme po dobu 20 min a uchováváme při 4 °C.

- **LB agarózové misky** (pH 7). 35 g LB agaru rozpustíme v 1 l ddH₂O. Sterilizujeme po dobu 20 min, přidáme ampicilin (100 µg/ml). Po rozlití do Petriho misek uchováváme médium při 4 °C.

Kontrola bakteriálních klonů

Druhý den byly na miskách pozorovány narostlé kolonie bakterií a to:

- bílé kolonie, kde došlo k inzerci cizorodé DNA do buněk a tím k porušení genu pro β-galaktosidázu
- modré kolonie, do nichž byl přenesen vektor bez inzertu (bez PCR produktu), což způsobilo, že zde probíhala tvorba genu pro β-galaktosidázu a tím docházelo k rozkladu substrátu X-gal (modré zbarvení).

Buňky, které vůbec neobsahovaly plazmidový vektor, na agaru nenarostly.

Kontrola bakteriálních klonů byla provedena pomocí PCR. Postup byl takový, že z agaru se sterilním párátkem vypíchlá bílá kolonie bakterií, která se následně přenesla na novou Petriho misku s pevným LB médiem. Poté se hrotem párátku převedla do mikrozumavky s předpřipraveným PCR mixem.

1. Reakce PCR byla prováděna v objemu 25 µl obsahujícím:

- 21,05 µl sterilní ddH₂O
- 2,5 µl 10× *DreamTaq buffer* (finální koncentrace 1×; Fermentas)
- 0,25 µl každého dNTP (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,1 mM; Fermentas)
- 0,5 µl reverzního primeru PopMV CP1r (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,2 µM)
- 0,5 µl forwardového primeru PopMV CP1f (zásobní roztok 10 µM; finální koncentrace 0,2 µM)
- 0,2 µl *DreamTaq* polymerázy (zásobní roztok 5 U/µl; finální koncentrace 1 U, Fermentas).

2. Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Podmínky během amplifikace jsou uvedeny v tabulce 2.

Pro vizualizaci výsledků byla použita elektroforetická separace nukleových kyselin pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Postup je podrobně popsán v kapitole 4.1.3.3.

4.2.2.5 Příprava plazmidů pro sekvenční analýzy

Z agaru byly sterilním párátkem vypíchnuty bílé kolonie bakterií. Celé párátko bylo vloženo do 50 ml falkony, která obsahovala 15 ml tekutého LB média a 15 μ l ampicilinu (100 μ g/ml). Vzorek byl inkubován za stálého míchání (100 RPM) ve 37 °C přes noc (přibližně 12 hod).

Druhý den byla provedena izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk pomocí sady *GenElute™ Plasmid MiniPrep Kit* (Sigma-Aldrich). Uvedený postup byl doporučen samotným výrobcem.

1. Do mikrozkušavky byly přelity 2 ml LB média s bakteriálními buňkami a následovala centrifugace (12 000 \times g, 1 min, 21 °C). Tento krok byl jednou zopakován.
2. Sediment buněk byl následně resuspendován v 200 μ l *Resuspension Solution*.
3. Poté bylo ke směsi přidáno 200 μ l *Lysis Solution* a celý obsah byl promíchán převrácením mikrozkušavky v ruce.
4. Po 3 min bylo ke směsi přidáno 350 μ l *Neutralization Solution*, poté byla mikrozkušavka opět 4 – 6 krát v ruce převrácena a následovala centrifugace (12 000 \times g, 10 min, 21 °C).
5. Vodní část byla převedena do nové mikrozkušavky se speciální kolonkou a následovala centrifugace (12 000 \times g, 1 min, 21 °C).
6. Vodní fáze byla odstraněna a bylo přidáno 500 μ l *Optional Wash Solution*, následovala centrifugace (12 000 \times g, 1 min, 21 °C).
7. Vodní fáze byla opět odstraněna a do kolonky bylo přidáno 750 μ l *Wash Solution*, následovala centrifugace (12 000 \times g, 1 min, 21 °C).
8. Poté byla provedena centrifugace tzv. „na sucho“ (12 000 \times g, 1 min, 21 °C).
9. Kolonka byla umístěna do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 70 μ l ddH₂O, následovala centrifugace (12 000 \times g, 1 min, 21 °C).

Takto připravená DNA byla použita pro sekvenaci.

4.2.3 Analýza sekvencí

Získané PCR produkty byly komerčně osekvenovány na automatickém sekvenačním analyzátoru ve firmě GATC Biotech AG (Německo). Pro oboustranné sekvenování PCR produktů byly použity univerzální primery plazmidového vektoru M13R (5' DCAGGAAACAGCTATGAC 3') a M13f (5' DGTAACGACGGCCAGT3').

Získané sekvence nukleotidů byly analyzovány pomocí programu BioEdit 7.2.5. Jednotlivé sekvence nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin byly porovnány mezi sebou a také s již publikovanými sekvencemi uvedenými v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Nakonec byla stanovena procentuální sekvenční identita izolátů.

5 VÝSLEDKY

5.1 Detekce PopMV v rostlinném materiálu

5.1.1 Detekce PopMV pomocí sérologické metody DAS-ELISA

Výsledky získané na základě diagnostických testů DAS-ELISA odhalily, že v rostlinném materiálu získaném od soukromých pěstitelů RRD nebyl v naprosté většině případů virus mozaiky topolu přítomný. Z 220 otestovaných stromů bylo 200 topolů vyhodnocených jako PopMV negativní (jednalo se o rostlinné vzorky z plantáží v Kačicích, Slaném, Buchově, Zdebuzevsi, Šternově, Slapech, Větrovech, Přáslavicích, Čáslavsku, Kámeni). Pouze na jediné lokalitě v Českém středohoří byla infekce virem mozaiky topolu zaznamenána a to ve velkém rozsahu. Spolehlivost testů byla potvrzena tím, že v každém testu, respektive na každé mikrotitrační destičce byly k testovaným vzorkům přiřazeny dvě negativní kontroly (v podobě extrakčního pufru a šťávy z viruprosté rostliny topolu) a jedna pozitivní kontrola (ze šťávy z infikované rostliny tabáku virem PopMV).

Přehled výsledků DAS-ELISA testu je uveden v tabulce 3. Výstupem ze spektrofotometru jsou hodnoty absorbance, pro které platí: je-li hodnota výsledku alespoň jednou tak vysoká než hodnota negativní kontroly, jedná se o pozitivní vzorek.

Tabulka 3: Přehled výsledku DAS-ELISA testu – soukromý pěstitelé.

		<>	1	2	3	4			<>	1	2	3	4
Kačice	A	0,061	0,078	0,067	0,544	Slaný	A	0,061	0,076	0,074	0,544		
	B	0,062	0,069	0,065	0,567		B	0,062	0,074	0,072	0,567		
	C	0,067	0,075	0,065	###		C	0,067	0,066	0,075	###		
	D	0,062	0,069	0,071	###		D	0,062	0,072	0,078	###		
	E	0,071	0,067	0,072	###		E	0,075	0,072	0,076	###		
	F	0,07	0,067	0,069	###		F	0,07	0,071	0,076	###		
	G	0,074	0,07	0,068	###		G	0,068	0,071	0,09	###		
	H	0,079	0,07	0,07	###		H	0,074	0,07	0,076	###		
Březno	<>		1	2	3	4							
	A	0,086	1,677	2,277	1,18								
	B	0,085	1,75	2,021	1,06								
	C	0,071	1,563	1,843	###								
	D	0,072	1,641	1,782	###								
	E	0,075	2,216	1,758	###								
	F	0,074	2,26	1,973	###								
	G	0,175	1,557	2,113	###								
H	0,166	1,735	2,117	###									

Vysvětlivky:

šedá – slepá kontrola

modrá – negativní kontrola

bílá – testované vzorky

červená – pozitivní kontrola

Tabulka 3: Přehled výsledku DAS-ELISA testu – soukromý pěstitel – pokračování.

Kámen	<>	1	2	3	4	Buchov	<>	1	2	3	4
	A	0,054	0,054	0,052	0,95		A	0,054	0,054	0,058	0,95
	B	0,056	0,055	0,051	0,973		B	0,056	0,054	0,063	0,973
	C	0,052	0,051	0,051	###		C	0,052	0,055	0,058	###
	D	0,059	0,053	0,056	###		D	0,059	0,057	0,062	###
	E	0,057	0,055	0,057	###		E	0,053	0,056	0,061	###
	F	0,055	0,055	0,055	###		F	0,051	0,056	0,058	###
	G	0,057	0,055	0,056	###		G	0,051	0,055	0,057	###
	H	0,056	0,057	0,06	###		H	0,053	0,058	0,06	###
Zdebuzeves	<>	1	2	3	4	Šternov	<>	1	2	3	4
	A	0,054	0,062	0,059	0,95		A	0,054	0,058	0,056	0,95
	B	0,056	0,062	0,059	0,973		B	0,056	0,059	0,058	0,973
	C	0,052	0,061	0,06	###		C	0,052	0,058	0,059	###
	D	0,059	0,062	0,06	###		D	0,059	0,059	0,058	###
	E	0,065	0,062	0,06	###		E	0,055	0,05	0,049	###
	F	0,059	0,063	0,063	###		F	0,056	0,052	0,054	###
	G	0,061	0,064	0,063	###		G	0,057	0,052	0,056	###
	H	0,061	0,073	0,061	###		H	0,057	0,053	0,057	###
Přáslavice	<>	1	2	3	4	Čáslavsko	<>	1	2	3	4
	A	0,081	0,067	0,071	1,022		A	0,081	0,071	0,077	1,022
	B	0,081	0,067	0,068	1,036		B	0,081	0,072	0,076	1,036
	C	0,065	0,07	0,074	###		C	0,065	0,077	0,079	###
	D	0,065	0,071	0,072	###		D	0,065	0,078	0,08	###
	E	0,071	0,072	0,074	###		E	0,069	0,075	0,073	###
	F	0,071	0,072	0,069	###		F	0,071	0,074	0,074	###
	G	0,071	0,073	0,074	###		G	0,073	0,078	0,074	###
	H	0,069	0,075	0,079	###		H	0,072	0,071	0,075	###
Slapy	<>	1	2	3	4	Větrovy	<>	1	2	3	4
	A	0,092	0,134	0,076	1,94		A	0,092	0,081	0,082	1,94
	B	0,095	0,127	0,078	2,095		B	0,095	0,079	0,078	2,095
	C	0,075	0,077	0,081	###		C	0,075	0,081	0,083	###
	D	0,074	0,078	0,082	###		D	0,074	0,083	0,081	###
	E	0,075	0,081	0,077	###		E	0,075	0,081	0,077	###
	F	0,074	0,079	0,079	###		F	0,079	0,086	0,081	###
	G	0,075	0,079	0,076	###		G	0,076	0,078	0,085	###
	H	0,076	0,085	0,078	###		H	0,081	0,08	0,083	###

Vysvětlivky:

šedá – slepá kontrola

bílá – testované vzorky

modrá – negativní kontrola

červená – pozitivní kontrola

5.1.2 Detekce PopMV pomocí metody RT-PCR

Detekce PopMV byla u několika vzorků provedena pomocí metody RT-PCR. Finální vizualizace se uskutečnila pomocí UV transiluminátoru po elektroforetické separaci nukleových kyselin. Z 10 testovaných volně rostoucích stromů topolu na území Kozí Hřbety u Suchdola byly tři rostliny identifikovány jako pozitivní na přítomnost PopMV (Obr. 2).

Na stejné lokalitě byl sledován i vliv ročního období na detekovatelnost viru mozaiky topolu v rostlinách. Zjištění bylo takové, že na konci zimního období (březen) není možné PopMV v topolech detekovat.

Obrázek 2: Detekce PopMV metodou RT-PCR (vlastní fotografie).



Elektroforeogram RT-PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery Popf2/Popr2, velikost produktu 386 bp. M. Low-Range DNA Ladder (Fermentas); 1 – 10: vzorky cDNA z testovaných topolů (vzorek 1, 3, 5 jsou dle tohoto elektroforeogramu pozitivní na přítomnost PopMV); N: negativní kontrola v podobě ddH₂O, P: pozitivní kontrola ve formě cDNA získané z PopMV infikovaných listů.

5.1.3 Detekce PopMV pomocí indikátorových rostlin

Detekce PopMV byla uskutečněna i pomocí indikátorových rostlin *Nicotiana megalosiphon*. Při inokulaci rostlin tabáku na začátku jara (duben) byly patrné příznaky napadení virem PopMV již po 10 dnech. Symptomy se projevily jako výrazné prosvětlení žilnatiny a deformace listů (Obr. 3). V druhé polovině léta (srpen) se úspěšnost přenosu postupně snižovala. Na přelomu léta a podzimu (září) se přenos nezdařil.

Obrázek 3: List rostliny *N. megalosiphon* s typickými příznaky napadení virem PopMV (vlastní fotografie).



5.2 Analýza genetické variability izolátů PopMV

5.2.1 Příprava vzorků pro sekvenci

Pro analýzu genetické variability bylo vybráno šest izolátů viru mozaiky topolu. Pět izolátů PopMV pocházelo z hostitelských rostlin *P. nigra* L. (PR3, KH1, KH3, BR1, BR3) a jeden vzorek pocházel z *Populus × canadensis* Moench 'NL-B-132b' (PR1). Izoláty PR1, KH1, KH3, BR1, BR3 pocházely z České republiky, pouze izolát PR3 byl získán z obce Velký Biel na Slovensku.

U všech vybraných vzorků za využití specifických primerů proběhla úspěšně amplifikace úseku genomu zodpovědného za kódování kompletního genu pro obalový protein viru. PCR produkty byly nejprve ligovány do bakteriálních plazmidových vektorů pSC-A (Agilent Technologies, USA) a následně zaslány na sekvenaci.

Po sekvenaci a vzájemném spojení úseků jsme získali parciální část genomu PopMV o velikosti 1007 nt, ve kterém byl identifikován jeden otevřený čtecí rámec (ORF5). Celý zápis sekvencí nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin je uveden v kapitole 10 Samostatné přílohy.

Na základě procentuální sekvenční identity byly dále mezi sebou porovnány nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence izolátů PopMV. Tyto sekvence byly zároveň porovnány i s dosud publikovanými sekvencemi izolátů PopMV a to konkrétně třemi z Německa (Acc. No. A4505475.1; Acc. No. X97765.1; Acc. No. X97683.1) a jednou z Velké Británie (Acc. No. X65102.1).

Nejprve byla sledována procentuální sekvenční identita v rámci nukleotidů mezi jednotlivými izoláty. Identita se pohybovala v rozmezí od **85** do **99** %. Nejvyšší shoda byla pozorována mezi izoláty KH3ctg, BR1ctg a BR3ctg (99 %). Naopak nejnižší shoda byla u izolátu PR1ctg a to vůči všem ostatním izolátům (85 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Sekvenční identita nukleotidů.

Seq->	PR1ctg	PR3ctg	KH1ctg	KH3ctg	BR1ctg	BR3ctg
PR1ctg	ID	85%	85%	85%	85%	85%
PR3ctg	85%	ID	95%	96%	96%	96%
KH1ctg	85%	95%	ID	98%	98%	98%
KH3ctg	85%	96%	98%	ID	99%	99%
BR1ctg	85%	96%	98%	99%	ID	99%
BR3ctg	85%	96%	98%	99%	99%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

Dále byla porovnávána procentuální sekvenční identita aminokyselin, odvozených od nukleotidů. Identita se pohybovala v rozmezí od **97** do **100** %. Nejvyšší shoda byla pozorována u izolátu BR1 vůči izolátům BR3, KH1, KH3 (100 %). Naopak nejnižší shoda byla u izolátu PR1 a to vůči izolátům KH1, KH3, BR1 a BR3 (97 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Sekvenční identita aminokyselin.

Seq->	PR1	PR3	KH1	KH3	BR1	BR3
PR1	ID	98%	97%	97%	97%	97%
PR3	98%	ID	99%	99%	99%	99%
KH1	97%	99%	ID	99%	100%	99%
KH3	97%	99%	99%	ID	100%	99%
BR1	97%	99%	100%	100%	ID	100%
BR3	97%	99%	99%	99%	100%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

Poté byla porovnávána procentuální sekvenční identita nukleotidů našich izolátů s již publikovanými sekvencemi. Identita se pohybovala v rozmezí od **84** do **99** %. Nejvyšší shoda byla pozorována u izolátu KH3ctg, BR1ctg a BR3ctg (99 %). Naopak nejnižší shoda byla u izolátu PR1ctg a to vůči izolátům X65102.2 a AY505475.1 (84 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Sekvenční identita nukleotidů.

Seq->	PR1 ctg	PR3 ctg	KH1 ctg	KH3 ctg	BR1 ctg	BR3 ctg	X65102.2	AY505475.1
PR1ctg	ID	85%	85%	85%	85%	85%	84%	84%
PR3ctg	85%	ID	95%	96%	96%	96%	95%	94%
KH1ctg	85%	95%	ID	98%	98%	98%	97%	96%
KH3ctg	85%	96%	98%	ID	99%	99%	97%	97%
BR1ctg	85%	96%	98%	99%	ID	99%	98%	97%
BR3ctg	85%	96%	98%	99%	99%	ID	98%	97%
X65102.2	84%	95%	97%	97%	98%	98%	ID	96%
AY505475.1	84%	94%	96%	97%	97%	97%	96%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

Dále byla porovnávána procentuální sekvenční identita aminokyselin, odvozených od nukleotidů našich izolátů s již publikovanými sekvencemi. Identita se pohybovala v rozmezí od **62** do **99** %. Nejvyšší shoda byla pozorována mezi izoláty PR3, BR1, BR3, KH1, KH3 (99 %). Naopak nejnižší shoda byla mezi izoláty PR1 a AY505475.1 (62 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Sekvenční identita aminokyselin.

Seq->	PR1	PR3	KH1	KH3	BR1	BR3	X65102	AY505475.1
PR1	ID	98%	97%	97%	97%	97%	95%	62%
PR3	98%	ID	99%	99%	99%	99%	98%	65%
KH1	97%	99%	ID	99%	99%	98%	98%	65%
KH3	97%	99%	99%	ID	99%	98%	98%	65%
BR1	97%	99%	99%	99%	ID	98%	98%	65%
BR3	97%	99%	98%	98%	98%	ID	97%	64%
X65102	95%	98%	98%	98%	98%	97%	ID	63%
AY505475.1	62%	65%	65%	65%	65%	64%	63%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

Poté byla porovnáována procentuální sekvenční identita nukleotidů našich izolátů opět s již publikovanými sekvencemi, s tím rozdílem, že u dvou z těchto sekvencí nebyly poskytnuty kompletní informace. Vše se tedy porovnávalo na úrovni parciální sekvence bílkovinného obalu. Identita se pohybovala v rozmezí od **82** do **99** %. Nejvyšší shoda byla pozorována u izolátu KH3ctg, BR1ctg a BR3ctg (99 %). Naopak nejnižší shoda byla u izolátu PR1ctg a to vůči izolátům AY505475.1.2 a X97765.1.1 (82 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Sekvenční identita nukleotidů – parciální sekvence bílkovinného obalu.

Seq->	PR1 ctg	PR3 ctg	KH1 ctg	KH3 ctg	BR1 ctg	BR3 ctg	X651 02.2	AY50 5475.1	X977 65.1	X976 83.1
PR1ctg	ID	83%	84%	84%	84%	83%	83%	82%	82%	84%
PR3ctg	83%	ID	94%	94%	95%	95%	95%	93%	95%	94%
KH1ctg	84%	94%	ID	98%	98%	98%	97%	95%	97%	97%
KH3ctg	84%	94%	98%	ID	99%	99%	97%	96%	97%	97%
BR1ctg	84%	95%	98%	99%	ID	99%	98%	96%	98%	98%
BR3ctg	83%	95%	98%	99%	99%	ID	98%	96%	98%	98%
X65102.2	83%	95%	97%	97%	98%	98%	ID	96%	98%	97%
AY505475.1	82%	93%	95%	96%	96%	96%	96%	ID	96%	96%
X97765.1	82%	95%	97%	97%	98%	98%	98%	96%	ID	97%
X97683.1	84%	94%	97%	97%	98%	98%	97%	96%	97%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

Nakonec byla porovnávána procentuální sekvenční identita aminokyselin, odvozených od nukleotidů našich izolátů s již publikovanými sekvencemi, a to opět na úrovni parciální sekvence bílkovinného obalu. Identita se pohybovala v rozmezí od **78** do **100 %**. Nejvyšší shoda byla pozorována mezi izoláty KH1ctgR, KH3ctgR, X65102 a X97765.1 (100 %). Naopak nejnižší shoda byla mezi izoláty PR1ctgR a AY505475.1 (78 %). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Sekvenční identita aminokyselin – parciální sekvence bílkovinného obalu.

Seq->	PR1 ctgR	PR3 ctgR	KH1 ctgR	KH3 ctgR	BR1 ctg	BR3 ctg	X651 02	AY50 5475.1	X977 65.1	X976 83.1
PR1ctgR	ID	99%	98%	98%	97%	98%	98%	78%	98%	97%
PR3ctgR	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%	79%	99%	99%
KH1ctgR	98%	99%	ID	100%	99%	99%	100%	79%	100%	99%
KH3ctgR	98%	99%	100%	ID	99%	99%	100%	79%	100%	99%
BR1ctg	97%	99%	99%	99%	ID	98%	99%	79%	99%	99%
BR3ctg	98%	99%	99%	99%	98%	ID	99%	79%	99%	98%
X65102	98%	99%	100%	100%	99%	99%	ID	79%	100%	99%
AY505475.1	78%	79%	79%	79%	79%	79%	79%	ID	79%	78%
X97765.1	98%	99%	100%	100%	99%	99%	100%	79%	ID	99%
X97683.1	97%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	78%	99%	ID

Vysvětlivky:

modrá - nejnižší hodnota (%)

červená - nejvyšší hodnota (%)

6 DISKUZE

6.1 Stav porostů topolu na území České republiky

Virus mozaiky topolu (*Poplar mosaic virus*, PopMV) je celosvětově rozšířený zástupce rodu *Carlavirus*. Virus byl monitorován v USA, Kanadě, Japonsku (Berg, 1964) a ve většině evropských zemí (Corte, 1959; Brčák a Blatný, 1962; Berg, 1962, 1964; Milinko a Schmelzer, 1966; Schmelzer, 1966; Navrátil a Boyer, 1968; Biddle a Tinsley, 1971a, 1971b). K rozšíření patogena přispěla zejména intenzivní mezinárodní a mezikontinentální výměna množitelského materiálu (Navrátil, 1979). Námí provedený monitoring volně rostoucích populací topolů potvrdil, že na území České republiky se opravdu vyskytují porosty infikované PopMV. Tyto stromy se ve většině případů vyznačovaly zřetelnými listovými příznaky napadení virem, obzvláště typickou chlorózou žilnatiny, což odpovídá symptomům popisovaným v předchozích studiích (Biddle a Tinsley, 1971a; Navrátil, 1979).

V současné době se v České republice čím dál více rozšiřuje trend pěstování topolů, coby rychle rostoucích dřevin, na produkci biomasy. Skupina dřevin, která je označována jako rychle rostoucí, se vyznačuje schopností dosáhnout vysoké produkce biomasy v krátkém časovém období ve srovnání s jinými druhy dřevin (Čížková a Čížek, 2009). Napadení stromů virem PopMV tuto jejich jedinečnou schopnost ohrožuje. Výška růstu infikovaných rostlin může být potlačena od 0 do 50 %. To závisí především na stáří stromu, na citlivosti pěstovaného kultivaru, na příslušném kmenu PopMV nebo na pěstebních podmínkách (Navrátil, 1979). Výsledkem však je, že jakákoli retardace růstu dřevin je významná z ekonomického hlediska, protože právě za účelem rychlého vytvoření biomasy jsou tyto plantáže pěstovány.

Dlouhověkost této monokultury dále přispívá ke kontinuálnímu nárůstu patogenů ve dřevinách. Proto je třeba přistupovat k tomuto druhu obhospodařování zemědělské půdy zodpovědně. Především v rámci zamezení šíření významné virové choroby viru mozaiky topolu je důležitou prevencí pěstovat zdravý a kvalitní rostlinný materiál.

Je potvrzeno, že PopMV je přenosný vegetativním množením (očkování, roubování), kořenovými srůsty a inokulací infikovanou šťávou z nemocné rostliny. Dosud nebyl prokázán přenos pomocí živočišného vektoru, semeny ani pylem (Navrátil, 1979; Cooper, 1981; Sinclair a Lyon, 2005). Námí testované vzorky (metoda DAS-ELISA), odebrané od

soukromých pěstitelů RRD, na přítomnost PopMV byly shledány ve většině případů jako viruprosté. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že pěstitele pro své plantáže používají kvalitní a zdravý materiál z matečních rostlin, které námi studovaný virus v sobě nemají. V lokalitě Českého Středohoří byl naopak k výsadbě zřejmě použit infikovaný pěstební materiál, což mělo za následek masivní zamoření celého pozemku daným virem. Takovýto porost by měl být určen k totální likvidaci, aby neplnil funkci rezervoáru PopMV v přírodě a patogen se dále nerozšiřoval do okolních porostů.

Dle výsledků naší práce můžeme dále soudit, že výběr vhodné doby pro detekce patogena v rostlinném materiálu je zcela nezbytný. Na základě našich testů bylo zřejmé, že na konci zimního období (březen) nebylo možné PopMV detekovat v topolech, o kterých jsme s jistotou věděli, že jsou tímto virem napadené, a to ani z květů, listů či lýka. To jen potvrzuje fakt, že koncentrace viru se zvyšuje až s nástupem pozdního jara, kdy se zároveň objevují první symptomy na plně rozvinutých listech (Sinclair a Lyon, 2005).

6.2 Propagace PopMV v indikátorových rostlinách *N. megalosiphon*

Pro bližší studii viru mozaiky topolu v zimních měsících je velmi užitečná propagace viru v indikátorových rostlinách *Nicotiana megalosiphon*, které se jeví jako nejcitlivější hostitelské rostliny (Biddle a Tinsley, 1971a). Nejvhodnější doba pro inokulaci rostlin nastává právě v období jara a léta, kdy jsou nejpříznivější podmínky, co se týče teploty a délky slunečního svitu, pro propagaci viru. Námi pozorované symptomy na listech, kterými byly chloróza žilnatiny následovaná drobnými nekrotizacemi a deformace listů, byly velmi podobné těm, které zmiňuje Biddle a Tinsley (1971a) nebo Van der Meer *et al.* (1980). Naopak zhoršené podmínky nabízí období pozdního léta a podzimu, kdy se inokulace opakovaně nedařila. Hlavní faktory ovlivňující úspěšnost přenosu tedy zřejmě byly: zkracující se délka dne v průběhu roku a kolísající teploty v závislosti na ročním období.

6.3 Variabilita PopMV

Kompletní nukleotidovou sekvenci viru mozaiky topolu poprvé popsali Smith a Campbell (2004). Uvádějí, že genomová RNA viru je dlouhá 8 742 nukleotidů. Genom viru v sobě nese šest otevřených čtecích rámců, z čehož první otevřený čtecí rámec (ORF1) je zodpovědný za kódování bílkovin souvisejících s replikací, další tři čtecí rámce (ORF2-ORF4) jsou tak zvané „movement“ proteiny (TGB), ORF5 je zodpovědný za translaci bílkovinného obalu a ORF6 za kódování bílkoviny s nukleotidovými vazebnými vlastnostmi. V rámci diplomové práce byla osekvenována část genomu zodpovědná za tvorbu bílkovinného obalu, tedy ORF 5. Délka úseku genomu byla 968 nt (321 aa), což zcela odpovídá předchozím studiím (Smith a Campbell, 2004).

Na základě výsledků procentuální sekvenční identity bylo prokázáno, že rozdíly ve shodě nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin nebyly výrazné. Jedinou výjimku tvoří izolát PR1. V předkládané studii byly všechny analyzované izoláty PopMV získané ze stejné sekce topolů, a to sekce *Aigeiros* (Biddle a Tinsley, 1971a; Chastagner, 2001). Pět ze šesti topolů bylo identifikováno jako zástupci druhu *P. nigra* L., pouze jediný studovaný izolát byl získaný z *Populus × canadensis* Moench 'NL-B-132b' a to právě izolát PR1. Zda je vyšší molekulární variabilita tohoto izolátu způsobená právě jeho hostitelem, však zůstává otázkou a předmětem našich dalších studií. Z hlediska rozdílného geografického původu (Česká republika versus Slovenská republika) nebyla mezi izoláty prokázána žádná heterogenita.

Kontzog a Ebrahim-Nesbat (1992) zjistili, že jednotlivé hybridy topolů, experimentálně inokulované PopMV, se liší ve schopnosti podpory replikace daného viru. Edwards *et al.* (1997) uvádí, že však není známa žádná přirozená imunita proti viru mozaiky topolu mezi komerčně nejvyužívanějšími hybridy, jako jsou *Populus nigra*, *P. trichocarpa* či *P. deltoides*.

Ochrana rostlin je založená na využívání zdravého množitelského materiálu (Van der Meer *et al.*, 1980). Dosažení rezistence vůči PopMV pomocí tradičního šlechtění (Kontzog a Ebrahim-Nesbat, 1992) či za využití genetického inženýrství při transformaci genomu pomocí bakterie *Agrobacterium* (Edwards *et al.*, 1997) bylo podrobně studováno, ale do dnešní doby nepřineslo žádný významný obrat v rámci využití přímo v praxi. Další možností je ozdravování matečnicových porostů za užití termoterapie a následného pěstování meristémových kultur. Zde však dochází k nevysvětlitelnému opětovnému infikování nově vysazených stromů virem (Cooper a Edwards, 1981).

7 ZÁVĚR

Úvodní část předkládané diplomové práce byla věnována monitoringu PopMV v České republice. Z námi získaných výsledků vyplývá, že na našem území je virus mozaiky topolu rozšířen zejména na volně rostoucích porostech topolů, zatímco komerčně pěstované rychle rostoucí topoly jsou ve většině případů bez-virózní.

Druhá část předkládané diplomové práce byla zaměřena na studium biologických vlastností PopMV pomocí indikátorových rostlin. Z výsledků studie vyplývá, že úspěšnost experimentálního přenosu viru mozaiky topolu pomocí infikované šťávy plně závisí na daném ročním období a s tím spojeném průběhu počasí.

Poslední, ale jistě neméně významná část předkládané práce byla věnována studiu variability izolátů PopMV na území České republiky. Na základě sekvenční identity nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin bylo patrné, že jednotlivé izoláty viru mozaiky topolu odebrané na území České republiky se od sebe procentuelně příliš neliší, variability této části genomu je tedy velmi nízká.

8 SEZNAM LITERATURY

8.1 Literární informační zdroje

- Anonym 1. 2013. Možnosti energetického využití biomasy. Ministerstvo zemědělství. Praha. 67 s. ISBN: 978-80-7434-122-9.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Robaglia, C., Lecoq, H. 2007. Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus ecology. Science Publishers. Enfield. 472 p. ISBN: 9781578083169.
- Atanasoff, D. 1935. Old and new virus diseases of trees and shrubs. *Phytopath. Z.* 8. 197.
- Atkinson, M. A., Cooper, J. I. 1976. Ultrastructural changes in leaf cells of poplar naturally infected with poplar mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 83. 395 – 398.
- Berg, T.M. 1962. Some characteristics of a virus occurring in poplars. *Nature* 194, 1302 – 1303.
- Berg, T.M. 1964. Studies on *poplar mosaic virus* and its relation to the host. *Medded. Landbouwhoges. Wageningen* 64 – 11, 1 – 59.
- Biddle, P. G., Tinsley, T. W. 1971a. *Poplar mosaic virus* in Great Britain. *New Phytol.* 70. 61 – 66.
- Biddle, P. G., Tinsley, T. W. 1971b. Some effects of *poplar mosaic virus* on the growth of poplar trees. *New Phytol.* 70. 67 – 75.
- Brčák, J., Blatný, C. 1962. Electron microscopic investigation of poplar mosaic. *Phytopathology* 52, 954 – 955.
- Celjak, I. 2008. Biomasa je nezbytná součást našeho života. *Energie* 21. 1 (2). 10 – 13.
- Celjak, I., Boháč, J., Kohout, P. 2007. Rádce pro začínající pěstitele plantáží rychle rostoucích topolů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. České Budějovice. 54 s. ISBN: 978-80-7394-011-9.
- Celjak, I., Boháč, J., Kohout, P. 2009. Sklizeň rychle rostoucích topolů pro energetické účely. *Úroda*. 57 (8). 42 – 44.
- Chastagner, G. A. 2001. Poplar Diseases. In: Jones, R. K., Benson, D. M. (eds.). *Diseases of Woody Ornamentals and Trees in Nurseries*. APS Press. St. Paul, Minn. p. 308-316. ISBN: 0-89054-264-3.
- 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.
- Clark, M. F., Bar J. M. 1984. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. *Methods in Virology*. 7. 51 – 85.
- Cooper, J. I. 1981. Viruses of trees. In: Last, F. T., Gardiner, A. S. (eds.). *Forest and woodland ecology: an account of research being done in ITE*. NERC/Institute of Terrestrial Ecology. Cambridge. p. 143-145. ISBN:
- Cooper, J. I., Edwards, M. L. 1981. The distribution of *poplar mosaic virus* in hybrid poplars and virus detection by ELISA. *Ann. appl. Biol.* 99. 53 – 61.

- Cooper, J.I., Edwards, M. L., Siwecki, R. 1986. The detection of *poplar mosaic virus* and its occurrence in a range of clones in England and Poland. Eur. J. For. Path. 16. 116 – 125.
- Corte, A. 1959. Ricerche sperimentali sul “mosaico” del Pioppo. Atti Ist. Bot. Univ. Lab. Crittog. Pavia, Ser. V. 17, 1 – 16.
- Čížková, L., Čížek, V. 2009. Pěstování rychle rostoucích dřevin v České republice. In: Rychle rostoucí dřeviny zdroj biomasy pro energetiku. Lesnická práce, s.r.o. Kostelec nad Černými lesy. s. 4-9. ISBN: 978-80-02-02110-0.
- Edwards, M. L., Liu, Y. Y., Hawes, W. S., Henderson, J., Cooper, J. I. 1997. Positive and negative sense coat protein gene-mediated protection against poplar mosaic carlavirus in *Nicotiana benthamiana*. Ann. appl. Biol. 130. 261 – 270.
- Hartmann, G., Nienhaus, F., Butin, H. 2001. Atlas poškození lesních dřevin. Nakladatelství Brázda, s.r.o. Praha. 289 s. ISBN: 80-209-0297-X
- Havlíčková, K. *et al.* 2008. Rostlinná biomasa jako zdroj energie. VÚKOZ. Průhonice. 83 s. ISBN: 978-80-85116-65-6.
- Jech, D., Havlíčková, K., Weger, J. 2003. Funkce porostů rychle rostoucích dřevin v krajině. In: Biomasa – Obnovitelný zdroj energie v krajině. Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasní zahradnictví Průhonice. Průhonice. s. 36-39. ISBN: 80-85116-32-4.
- Kapitola, P., Růžička, T., Kroutil, P. 2011. Karanténní škodlivé organismy na lesních dřevinách. Státní rostlinolékařská správa. Praha. 63 s.
- Kassanis, B. 1970. *Tobacco necrosis virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83; UK.
- Kerlan, K. 2006. Potato virus Y. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83; UK.
- Koblížek, J. 2006. Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. Sursum. Tišnov. 551 s. ISBN: 80-7323-117-4.
- Kohout, P., Celjak, I., Boháč, J., Pavelcová, L. 2010. Rychle rostoucí dřeviny v energetice (topoly a vrby). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. 101 s. ISBN: 978-80-7394-247-2.
- Kolařík, J. *et al.* 2005. Péče o dřeviny rostoucí mimo les - II. ČSOP. Vlašim. 710 s. ISBN: 80-86327-44-2.
- Kontzog, Von H. G., Ebrahim-Nesbat F. 1992. Ermittlung und Bewertung quantitativer Virusresistenz von Pappeln nach Inokulation mit Pappelmosaik-Virus (*poplar mosaic virus*, PopMV). European Journal of Forest Pathology 22. 193 – 203.
- Malinová, M. 2006. Nejvýznamnější choroby a škůdci topolů. Lesnická práce. 85 (11). 20 – 21.
- Milinko, I., Schmelzer, K. 1966. A nyárfa-mozaikvirus hazai előfordulása. Különleynyomat Az erdő.
- Morales, F. J. V. 2006. Serology. In: Khan, J. A., Dijkstra, J. (eds.). Handbook of Plant Virology. Haworth Press. New York. 145 – 156. ISBN: 978-1-56022-978-0.
- Murant, A. F. 1970. *Arabis mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83; UK.

- Naylor, M., Reeves, J., Cooper, J. I., Edwards, M. L. Wang, H. 2004. Construction and properties of a gene-silencing vector based on *Poplar mosaic virus* (genus *Carlavirus*). *Journal of Virological Methods* 124. 27 – 36.
- Navratil, S. 1979. Virus and virus-like diseases of poplar: Are They threatening diseases? Fayle, D. C. F., Zsuffa, A., Anderson, H. W. (eds). Report in 19: Poplar Research, Management and Utilization in Canada. Ont. Minist. Nat. Resource For. Res. Inf. Pap. 102.
- Navrátl, S., Boyer, M.G. 1968. The identification of *poplar mosaic virus* in Canada. *Cand. J. Bot.* 46, 722 – 723.
- Newcombe, G., Chastagner, G. A. 1993. First report of the Eurasian poplar leaf rust fungus, *Melampsora larici-populina*, in North America. *Plant Dis.* 77. 532 – 535.
- Newcombe, G., Chastagner, G. A., Callan, B. E., Ostry, M. E. 1995. An epidemic of Septoria leaf spot on *Populus trichocarpa* in the Pacific Northwest in 1993. *Plant Dis.* 79. 212.
- Nienhaus, F., Butin, Böhmer, B. 1998. Atlas chorob a škůdců okrasných dřevin. Nakladatelství Brázda, s.r.o. Praha. 287 s. ISBN: 80-209-0275-9.
- Ostry, M. E. 1987. Biology of *Septoria musiva* and *Marssonina brunnea* in hybrid *Populus* plantations and control of Septoria canker in nurseries. *Eur. J. For. Pathol.* 17. 158 – 165.
- Regenmortel, M. H. V. 2006. Serology. In: Khan, J. A., Dijkstra, J. (eds.). *Handbook of Plant Virology*. Haworth Press. New York. 145 – 156. ISBN: 978-1-56022-978-0.
- Robinson, D. J. 2003. *Tobacco rattle virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83; UK.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology.* 107. 411 – 420.
- Schmelzer, K. 1966. Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 5 Mitt: Virosen an Populus und Sambucus. *Phytopath. Z.* 55, 317 – 351.
- Sinclair, W. A., Lyon, H. H. 2005. *Diseases of Trees and Shrubs*. Cornell University Press. Ithaca. p. 680. ISBN: 0-8014-4371-7.
- Smith, C. M., Campbell, M. M. 2004. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of *Poplar mosaic virus* (genus *Carlavirus*). *Arch Virol.* 149. 1831 – 1841.
- Stace-Smith, R. 1985. Tobacco ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83; UK.
- Šutić, D. D., Ford, R. E., Tošić, M. T. 1999. *Handbook of plant virus diseases*. CRC Press. Boca Raton. p. 584. ISBN: 0-8493-2302-9.
- Tomiczek, Ch., Cech, T., Krahan, H., Perny, B., Hluchý, M., Šefrová, H. 2005. Atlas chorob a škůdců okrasných dřevin. Biocont Laboratory spol. s.r.o. Brno. 219 s. ISBN: 80-901874-5-5

- Van der Meer, F. A., Maat, D. Z., Vink, J. 1980. *Poplar mosaic virus: purification, antiserum preparation, and detection in poplars with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and with infectivity tests on Nicotiana megalosiphon*. Neth. J. Pl. Path. 86. 99 – 110.
- Weger, J. 2004. Biomasa: palivo, které roste. Zemědělec. 12 (32). 8.
- Weger, J. 2009a. Rámcová typologie zemědělských půd pro pěstování vybraných klonů topolů a vrb k energetickému využití v České republice. In: Rychle rostoucí dřeviny zdroj biomasy pro energetiku. Lesnická práce, s.r.o. Kostelec nad Černými lesy. s. 10-15. ISBN: 978-80-02-02110-0.
- Weger, J. 2009b. Topoly a vrby k energetickému užití. Zemědělec. 17 (27). 13 – 14.

8.2 Elektronické informační zdroje

- Anonym 2. Administrativní postup před výsadbou plantáže rychle rostoucích dřevin (RRD) [online]. 8.července 2013. [2014-11-25]. Dostupné z < <http://eagri.cz/public/web/mze/zivotni-prostredi/obnovitelne-zdroje-energie/biomasa/rrd/administrativni-postup-pred-vysadbou.html> >
- Anonym 3. Předpis č. 114/1992 Sb. - Zákon České národní rady o ochraně přírody a krajiny [online]. [cit. 2014-10-16]. Dostupné z <<http://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-114>>.
- Anonym 4. International Comittee on Taxonomy of Viruses [online]. [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> >.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Anglický název	Český název
aa	amino-acid	aminokyselina
ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	Virus mozaiky huseníku
bp	base pairs	páry bází
BPEJ		bonitovaná půdně ekonomická jednotka
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA	sendvičová ELISA
ddH ₂ O	double-distilled water	re-destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleic triphosphate	deoxyribonukleotid trifosfát
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	imunochemická testovací metoda na pevné fázi
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization	Evropská a Středozevní organizace ochrany rostlin
EU	European Union	Evropská unie
g (RCF)	relative centrifugal force	relativní odstředivá síla
IgG	immunoglobulin G	imunoglobulin G
IgG-AP	immunoglobulin G linked antibody	imunoglobulin G s protilátkou
MW	megawatt	megawatt
MZe	Ministry of Agriculture	Ministerstvo zemědělství
MŽP	Ministry of Environment	Ministerstvo životního prostředí
nt	nucleotide	nukleotid
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PopMV	<i>Poplar mosaic virus</i>	Virus mozaiky topolu
PVY	<i>Potato virus Y</i>	Y virus bramboru
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RPM	rounds per minute	otáčky za minutu
RRD	fast growing trees	rychle rostoucí dřeviny
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	reverzní transkripce – polymerázová řetězová reakce
spp.	species	species
ssRNA	single stranded ribonucleic acid	jednovláčená ribonukleová kyselina
ŠO		škodlivý organismus
Taq	DNA polymerase from <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polymeráza z <i>Thermus aquaticus</i>
TNV	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Virus nektrózy tabáku
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRSV	<i>Tobacco rattle virus</i>	Virus nekrotické kadeřavosti tabáku
TRV	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Virus kroužkovitosti tabáku
UV	ultraviolet light	ultrafialové záření
VÚKOZ	The Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening	Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalactoside	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

10 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Příloha 1: Zázpis sekvence nukleotidů – Průhonice – PR1.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGCGTGTGATCGTTTATTAATATGAGTGGAGAACAGACTGAACAGATTTCTAAAGAGCAGGCC
GCGGCTGCAGAACAGGCTAAGAAGGAACAAATTGCAGAGGGCAAGAAGCCGGCTGAAGGGTCCGAGGCAGAACGTCGCAA
GAAGAACATTGCAGAAATAGCAAAGCTCAATGAGAAGGCCAGGGGGCAAAGAAGCAGGTGGCTGAGCAGGAGGAGACTA
CTGCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACCTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAACAACAAAGTTAAAAACCCTGCT
ATGGAGAGTGAAACTGAGCCCGCCCTCGCAGATGAGCTCAAACCAGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGGGCCAACTGTGACTG
ATCTTCAGAAGATGAAGTGAATGCGGAATCCAACAAGATAGCTACGGCTGATGACATGGCCTTCATCGAGGCTGAGTTCCA
GTCTTTAGGTGTCCCAAAGAGAATCTGGCGAAAGTGATGTGGACCCTGACTCGTTACTGTGTAGGAGCCAGTAGCTCGCAAT
ACTTGGACCCAAAGGGTGAGGAAGAAAAGCTCTGTGGTGGAGTACTAGGGCGGCCTTAATAGCGTGCATCAAGAAGAGGA
GCACCCTGAGGAAGGTATGCCGGCTATACGCACCCGTTGTTTGAAGTACATGTTAGTCAACAATGTCCCCCAGAAGATTGG
CAGTCCAAGGGCTTACTGAAGAGACTAAGTTCGCTGCTTTTGACACCTTCGATTTTGTGATGAATCCTGCTGCCATCCAACCC
TTGGAAGGTCTGATTCGTTCCCGACGAAGGCTGAGATCATAGCCAACGAAACTCATAAGAGGATCGCACTGGATCGAAATG
CAAACAATGAAAGATTTGCGAATTTAGGAAGTGAATAACAGGTGAAAAATTTGGCTGCAGAGTAGGGACCAAGTGGCGCG
AGAGCAAGTGCGACAATGGTTAAC

Příloha 2: Zázpis sekvence nukleotidů – Průhonice – PR3.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGCGTGAATCGTTACTAATATGAGTGGAGAACAACAGAACAGATTTCCAAAGACCAGGCA
GCTGCTGCAGAGCAGGCCAGGAAAGAGCAAATTGCTGAAGGTAAGAAGGCTGCTGAGAGTCCGAGGCTGAACGCCGCAAG
AAGAATATTGCAGAGATAGCAAACTCAATGAGAAGGCCAGGGAGGCAAGAACAAGGCTGCTGAACAGGAGGAGACTACT
GCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACTTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAATAACAAGGTTAAGAACCCTGCTAT
GGAAAGTGAAACTGAGCCAGCCCTCGCAGATGAGCTTAAGCCGGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGGGCCGACTGTAACGAC
CTGCAGAAGATGAAGTGAATGCTGAGTCTAACAAGATGGCCACTGCTGATGACATGGCCTTTATTGAAGCTGAATCCAGT
CTTTGGGGTTCCAAAGGAAAAGTGGCAAAAGTTATGTGGACTCTGACTCGCTACTGCGTGGGGCTAGTAGTCCCAGTAT
TTGGACCCCAAAGGTGAGGAGGAGAAAAGTGTGCGGTGGAGTTACAAGAGCAGCTTTAATTGCTTGTATCAAGAAGAGGAGCA
CGTTGAGAAAAGGTGTGCCGGCTTTATGCGCCCATCGTGTGGAATTACATGTTGGTTAACAACGTGCCCTCCAGAGGATTGGCAG
TCCAAGGGCTTCACTGAGGAGACAAAATTTGCCGCTTTGATACTTTTGACTTTGTGATGAACCCTGCTGCTATCCAGCCTTTA
GAGGGGTTAATTCGCTCTCCAACGAAGGCTGAAATCATAGCCAACGAGACTCATAAAAAGGATCGCACTAGACCGAAAATGCTA
ATAACGAAAGATTTGCAAACCTTAGGGAGTGAATCACTGGGGCAAGTTTGGTTGTCGGGTAGGAACGAAGTGGCGTGAGA
GCAAGTGTGACAATGGTTAAC

Příloha 3: Zázpis sekvence nukleotidů – Kozi Hřbety (Suchdol) – KH1.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGTGTGTGATCGTTTACTAATATGAGTGGAGAACAACACTGAACAGATTTCCAAAGACCAGGCA
GCTGCTGCTGAGCAGGCCAGGAAAGAGCAAATTGCTGAAGGTAAGAAGGCTGCAGAGAGTCCGAGGCTGAACGCCGCAAG
AAGAATATTGCAGAGATAGCAAACTCAATGAGAAGGCCAGGGAGGCGAAGAACAAGACTACTGAGCAGGAGGAGACTACT
GCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACTTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAATAACAAGGTTAAGAACCCTGCTAT
GGAAAGTGAAACTGAGCCAGCCCTCGCAGATGAGCTTAAGCCGGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGACCAACTGTGACCGAC
CTTCAGAAGATGAAGTGAATGCTGAGTCTAACAAGATGGCCACCGCTGATGATATGGCCTTTATTGAAGCTGAATCCAGTC
TCTGGGGTCCCAAAGGAAAAGTGGCAAAAGTTATGTGGACTCTGACTCGCTACTGCGTTGGGGCTAGTAGTCCCAGTATT
TAGACCCCAAAGGTGAGGAGGAGAAGCTTTGCGGCGGAGTTACTAGAGCAGCTTTAATAGCTTGTATCAAAAAGAGGAGTAC
GTTGAGGAAAGTATGCCGGCTTTACGCGCCCATCGTGTGGAATTACATGTTGGTCAACAACGTTCCCTCCAGAAGATTGGCAGT
CCAAGGGCTACACTGAGGAGACAAAATTTGCCGCTTTGATACTTTTGACTTTGTGATGAACCCTGCTGCGATCCAGCCTTTG
GAGGGGTTGATTCGCTCGCCAACGAAAGCTGAAATCATAGCCAACGAGACTCATAAAAAGGATTGCACTGGACCGAAAATGCTA
ATAACGAAAGATTTGCAAACCTTAGGGAGTGAATCACTGGGGGAAATTCGGTTGTCGGGTAGGTACAAAGTGGCGCGAGA
GCAAGTGTGACAATGGTTAAC

Příloha 4: Zázpis sekvence nukleotidů – Kozi Hřbety (Suchdol) – KH3.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGCTTGTGATCGTTACTAATATGAGTGGAGAACAACACTGAACAGATTTCCAAAGACCAGGCA
GCTGCTGCTGAGCAGGCCAGGAAAGAGCAAATGCTGAAGGTAAGAAGGCTGCAGAGAGTCCGAGGCTGAACGCCGCAAG
AAGAATATTGCAGAGATAGCAAACTCAATGAGAAGGCCAGGGAGGCAAAGAAACAGGCTACTGAGCAGGAGGAGACTACT
GCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACTTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAATAACAAGGTTAAGAACCCTGCTAT
GGAAAGTGAACTGAACCAGCCCTCGCAGATGAGCTTAAAGCCGGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGGCCAACTGTGACCGAC
CTTCAGAAGATGAAGTGAATGCTGAGTCTAACAAGATGGCCACCGCTGATGATATGGCCTTTATTGAAGCTGAATTCCAGTC
TCTGGGGGTCCCAAAGGAAAACCTGGCAAAAGTTATGTGGACTCTGACTCGCTACTGCGTCGGGGCTAGTAGCTCCAGTATT
TAGACCCTAAAGGTGAGGAAGAGAAGCTTTGCGGCGGAGTTACTAGAGCAGCTTTGATAGCTTGTATCAAGAAGAGGAGTAC
GTTGAGGAAAAGTGTGCCGCTTTACGCGCCCATCGTGTGGAATTACATGTTGGTCAACAACGTTTCTCCAGAAGATTGGCAGT
CCAAGGGCTACACTGAGGAGACAAAATTTGCCGCTTTGATACTTTTGACTTTGTGATGAACCCTGCTGCGATCCAGCCTTTG
GAGGGGTTAATTCGCTCGCCAACGAAGGCTGAAATCATAGGCAACGAGACTCATAAAAGGATTGCACTGGACCGAAATGCTA
ATAACGAAAGATTTGCAAACTTAGGGAGTGAGATCACTGGGGGAAGTTCGGTTGTCGGGTAGGCACAAAGTGGCGTGAGA
GCAAGTGTGATAATGGTTAAC

Příloha 5: Zázpis sekvence nukleotidů – Březno – BR1.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGCGTGTGATCGTTACTAATATGAGTGGAGAACAACACTGAACAGATTTCCAAAGACCAGGCA
GCTGCTGCTGAGCAGGCCAGGAAAGAGCAAATGCTGAAGGTAAGAAGGCTGCAGAGAGTCCGAGGCTGAACGCCGCAAG
AAGAATATTGCAGAGATAGCAAACTCAATGAGAAGGCCAGGGAGGCAAAGAAACAGGCTACTGAGCAGGAGGAGACTACT
GCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACTTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAATAACAAGGTTAAGAACCCTGCTAT
GGAAAGTGAACTGAGCCAGCCCTCGCAGATGAGCTTAAAGCCGGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGGCCAACTGTGACCGAC
CTTCAGAAGATGAAGTGAATGCTGAGTCTAACAAGATGGCCACCGCTGATGATATGGCCTTTATTGAAGCTGAATTCCAGTC
TCTGGGGGTCCCAAAGGAAAACCTGGCAAAAGTTATGTGGACTCTGACCCGCTACTGTGTCGGGGCTAGTAGCTCCAGTATT
TAGACCCCAAAGGTGAGGAGGAGAAGCTTTGCGGCGGAGTTACAAGAGCAGCTTTAATAGCTTGTATCAAGAAGAGGAGTA
CGTTGAGGAAAGTGTGCCGCTTTACGCGCCCATCGTGTGGAATTACATGTTGGTCAACAACGTTCTCCAGAAGATTGGCAG
TCCAAGGGCTACACTGAGGAGACAAAATTTGCCGCTTTGATACTTTTGACTTTGTGATGAACCCTGCTGCGATCCAGCCTTT
GGAGGGGTTAATTCGCTCGCCAACGAAGGCTGAAATCATAGCCAACGAGACTCATAAAAGGATTGCACTGGACCGAAATGCT
AATAACGAAAGATTTGCAAACTTAGGGAGTGAGATCACTGGGGGAAGTTCGGTTGTCGGGTAGGCACAAAGTGGCGTGAG
AGCAAGTGTGATAATGGTTAAC

Příloha 6: Zázpis sekvence nukleotidů – Březno – BR3.

AGCTGTGCCTTAGGTTATAGGCGTGTGATCGTTACTAATATGAGTGGAGAACAACACTGAACAGATTTCCAAAGACCAGGCA
GCTGCTGCTGAGCAGGCCAGGAAAGAGCAAATGCTGAAGGTAAGAAGGCTGCAGAGAGTCCGAGGCTGAACGCCGCAAG
AAGAATATTGCAGAGATAGCAAACTCAATGAGAAGGCCAGGGAGGCGAAGAAACAGGCTACTGAGCAGGAGGAGACTACT
GCGTCTCTACTTGAACGTTTTAACTTGCTTAAAGAATGGCATCTCAATCAGCAAGTTAATAACAAGGTTAAGAACCCTGCTAT
GGAAAGTGAACTGAGCCAGCCCTCGCAGATGAGCTTAAAGCCGGACATGTGCAACCTTTTTGCGAGGCCAACTGTGACCGAC
CTTCAGAAGATGAAGTGAATGCTGAGTCTAACAAGATGGCCACCGCTGATGATATGGCCTTTATTGAAGCTGAATTCCAGTC
TCTGGGGGTCCCAAAGGAAAACCTGGCAAAAGTTATGTGGACTCTGACTCGCTACTGCGTCGGGGCTAGTAGCTCCAGTATT
TAGACCCCAAAGGTGAGGAGGAGAAGCTTTGCGGCGGAGTTACAAGAGCAGCTTTGATAGCTTGTATCAAGAAGAGGAGTA
CGTTGAGGAAAGTGTGCCGCTTTACGCGCCCATCGTGTGGAATTACATGTTGGTCAACGACGTTCTCCAGAAGATTGGCAG
TCCAAGGGCTACACTGAGGAGACAAAATTTGCCGCTTTGATACTTTTGACTTTGTGATGAACCCTGCTGCGATCCAGCCTTT
GGAGGGGTTAATTCGCTCGCCAACGAAGGCTGAAATCATAGCCAACGAGACTCATAAAAGGATTGCACTGGACCGAAATGCT
AATAACGAAAGATTTGCAAACTTAGGGAGTGAGATCACTGGAGGGAAGTTCGGTTGTCGGGTAGGCACAAAGTGGCGTGAG
AGCAAGTGTGACAATGGTTAAC

Příloha 7: Zázpis sekvencí aminokyselin – Průhonice – PR1.

MSGEQTEQISKEQAAAAEQAKKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKARGAKKQVAEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
QVNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKIATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTR
YCVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNNVPPEDWQSKGFTEETKFAAFDTDFV
MNPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIANETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

Příloha 8: Zázpis sekvencí aminokyselin – Průhonice – PR3.

MSGEQTEQISKDQAAAAEQARKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKAREAKKQAAEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
QVNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKMATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTR
YCVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNNVPPEDWQSKGFTEETKFAAFDTDFV
NPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIANETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

Příloha 9: Zázpis sekvencí aminokyselin – Kozi Hřbety (Suchdol) – KH1.

MSGEQTEQISKDQAAAAEQARKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKAREAKKQTTEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
VNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKMATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTRY
CVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNNVPPEDWQSKGYTEETKFAAFDTDFV
NPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIANETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

Příloha 10: Zázpis sekvencí aminokyselin – Kozi Hřbety (Suchdol) – KH3.

MSGEQTEQISKDQAAAAEQARKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKAREAKKQATEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
QVNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKMATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTR
YCVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNNVPPEDWQSKGYTEETKFAAFDTDFV
NPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIGNETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

Příloha 11: Zázpis sekvencí aminokyselin – Březno – BR1.

MSGEQTEQISKDQAAAAEQARKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKAREAKKQATEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
QVNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKMATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTR
YCVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNNVPPEDWQSKGYTEETKFAAFDTDFV
NPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIANETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

Příloha 12: Zázpis sekvencí aminokyselin – Březno – BR3.

MSGEQTEQISKDQAAAAEQARKEQIAEGKKAESSEAERRKKNIAEIAKLNEKAREAKKQATEQEETTASLLERFNLLKEWHLNQ
QVNNKVKNPAMESETEPALADELKPDMNSLNFARPTVTDLQKMKWNAESNKMATADDMAFIEAEFQSLGVPKENLAKVMWTLTR
YCVGASSSQYLDPKGEEELKCGGVTRAALIAKIKRSTLRKVCRLYAPIVWNYMLVNDVPPEDWQSKGYTEETKFAAFDTDFV
NPAAIQPLEGLIRSPTKAEIIANETHKRIALDRNANNERFANLGSEITGGKFGCRVGTKWRESKCDNG

SEZNAM PŘÍLOH

Obrázky

Obrázek 1: Listy topolů napadené virem mozaiky topolu (vlastní fotografie).	24
Obrázek 2: Detekce PopMV metodou RT-PCR (vlastní fotografie).....	42
Obrázek 3: List rostliny <i>N. megalosiphon</i> s typickými příznaky napadení virem PopMV (vlastní fotografie).	43

Tabulky

Tabulka 1: Seznam rychle rostoucích dřevin (RRD).	6
Tabulka 2: Použité primery, programy PCR a velikosti fragmentů produktů PCR.	31
Tabulka 3: Přehled výsledku DAS-ELISA testu – soukromý pěstitel.	40
Tabulka 4: Sekvenční identita nukleotidů.	44
Tabulka 5: Sekvenční identita aminokyselin.	45
Tabulka 6: Sekvenční identita nukleotidů.	45
Tabulka 7: Sekvenční identita aminokyselin.	46
Tabulka 8: Sekvenční identita nukleotidů – parciální sekvence bílkovinného obalu.	47
Tabulka 9: Sekvenční identita aminokyselin – parciální sekvence bílkovinného obalu.	48

Samostatné přílohy

Příloha 1: Zápis sekvence nukleotidů – Průhonice – PR1.....	58
Příloha 2: Zápis sekvence nukleotidů – Průhonice – PR3.....	58
Příloha 3: Zápis sekvence nukleotidů – Kozí Hřbety (Suchdol) – KH1.	58
Příloha 4: Zápis sekvence nukleotidů – Kozí Hřbety (Suchdol) – KH3.	59
Příloha 5: Zápis sekvence nukleotidů – Březno – BR1.....	59
Příloha 6: Zápis sekvence nukleotidů – Březno – BR3.....	59
Příloha 7: Zápis sekvencí aminokyselin – Průhonice – PR1.....	60
Příloha 8: Zápis sekvencí aminokyselin – Průhonice – PR3.....	60
Příloha 9: Zápis sekvencí aminokyselin – Kozí Hřbety (Suchdol) – KH1.....	60
Příloha 10: Zápis sekvencí aminokyselin – Kozí Hřbety (Suchdol) – KH3.....	60
Příloha 11: Zápis sekvencí aminokyselin – Březno – BR1.	60
Příloha 12: Zápis sekvencí aminokyselin – Březno – BR3.	60