

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin

**A virus třešně a latentní virus meruňky
- studium hostitelského okruhu a rozšíření v ČR**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Konzultant: Ing. Lenka Grimová

Autor práce: **Bc. Eliška Žárová**

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „A virus třešně a latentní virus meruňky - studium hostitelského okruhu a rozšíření v ČR“ vypracovala samostatně a použila pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne 6. 4. 2010

Bc. Eliška Žárová

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. za odbornou podporu, Jaroslavě Vospělové za neutuchající péči o rostliny, Ing. Janě Drabešové za možnost spoluúčasti ve skupině zabývající se monitoringem virů a Ing. Lence Grimové za ochotnou pomoc a za trpělivé vedení při provádění pokusů, díky němuž mohla vzniknout tato práce.

Autorský referát

Peckoviny patří v České republice ke skupině ovocných dřevin pěstovaných s velkou hojností a oblibou, avšak péče o ně přináší i mnohá úskalí. Kromě poměrně náročných stanovištních podmínek jsou peckoviny hostiteli mnoha patogenů, z nichž mezi nejškodlivější patří viry.

Mezi nejnověji objevené viry peckovin, o nichž najdeme zmínky teprve v devadesátých letech minulého století, patří i latentní virus meruňky (*Apricot latent virus*, ApLV) a A virus třešně (*Cherry virus A*, CVA). Přestože se studiem těchto virů zabývalo již mnoho výzkumů po celém světě, informace o jejich biologické a strukturální charakteristice jsou stále omezené a nedostačující. Není znám jiný, než mechanický princip přenosu viru na rostlinu, není znám ekonomický dopad na výnos ovoce ani na životaschopnost rostlin a přes prokazatelný výskyt virů v rostlině velmi často nedochází k žádnému projevu symptomů, které bývají pro jiné viry charakteristické.

Cílem této práce bylo seznámit se s jmenovanými viry, prozkoumat jejich bylinný hostitelský okruh a pokusit se o potvrzení jejich přítomnosti v České republice. Bylinní hostitelé byli voleni z pěti čeledí (*Amaranthaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae*) a jednalo se o druhy *Nicotiana occidentalis*, *N. occidentalis* 'Obligua', *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. sanderae*, *N. longiflora*, *N. tabacum* 'Samsun', *N. tabacum* 'White Burley', *N. silvestris*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo* var. *oleifera*, *Chenopodium botrys*, *Ch. capitatum*, *Ch. amatanticolor*, *Ch. schraderian*, *Ch. faetidum*, *Ch. giganteum*, *Ch. bonus-henricus*, *Physalis peruviana*, *Gomphrena globosa* a *Phaseolus vulgaris*. Byliny byly inokulovány pomocí pěti odlišných pufrů, a inokulované rostliny byly dále testovány metodami izolace RNA a amplifikace hledaných úseků polymerázovou řetězovou reakcí za pomoci metody RT-PCR. Ačkoliv inokulace proběhla u početné skupiny hostitelů, během testování se neprokázal výskyt zkoumaných virů byť u jediného z nich. Tento výsledek ovšem nebyl zcela neočekávaný.

Monitoring virů v sadech rozmístěných po celém území České republiky naopak přinesl nečekané objevení výskytu virů - u ApLV se jednalo o jeden výskyt, u CVA byl výskyt potvrzen na dvou lokalitách. Díky těmto výsledkům je zjevné, že studium ApLV a CVA v České republice má svůj význam a bylo by vhodné věnovat se mu i v dalších letech.

Klíčová slova: CVA, ApLV, bylinný hostitelský okruh, peckoviny, RT-PCR

Summary

Stone fruits belong to a group of fruit trees, which is often and popularly grown in the Czech Republic, but the care about them brings also many difficulties. In addition to relatively hard stand conditions, stone fruits are hosts of many pathogens, from which the most damaging ones are the viruses.

Among the most recently discovered stone fruit viruses, from which we could find references only in the ninetieth years of the last century, the *Apricot latent virus* (ApLV) and the *Cherry virus A* (CVA) are of our interest. Even though many researches were made all over the world because of them, still the knowledge of their biological and structural characteristics is limited and insufficient. There is not known any other plant transmission of virus except mechanical. No economical impact is known either to a fruit profit or to tree fitness. Often, no manifestation of symptoms typical for other viruses is seen, although an occurrence of virus in a plant is provable.

The aim of this work was to get familiar with these viruses, to study their herbaceous host range and to try to confirm the presence of the viruses in the Czech Republic. Herbaceous hosts were chosen from five families (*Amaranthaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae*) and the species were *Nicotiana occidentalis*, *N. occidentalis* 'Obligua', *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. sanderae*, *N. longiflora*, *N. samsun*, *N. tabacum* 'White Burley', *N. silvestris*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo* var. *oleifera*, *Chenopodium botrys*, *Ch. capitatum*, *Ch. amatanticolor*, *Ch. schraderian*, *Ch. faetidum*, *Ch. giganteum*, *Ch. bonus-henricus*, *Physalis peruviana*, *Gomphrena globosa* a *Phaseolus vulgaris*. Herbs were inoculated within five different buffers and inoculated plants were onward tested with methods of RNA isolation and seek segments amplification by polymerase chain reaction method RT-PCR. Although the inoculation passed off with a large host group, there was no positive presence of investigated viruses in single one of them. This result was not unexpected.

Monitoring of viruses in orchards located in whole region of the Czech Republic has brought a non expected detection of virus occurrence – one occurrence for ApLV and two occurrences for CVA were confirmed at two localities. Thanks to these results, it is evident that the research of ApLV and CVA in the Czech Republic has its sense and it would be appropriate to pay attention to it in next years.

Keywords: CVA, ApLV, herbaceous hosts, stone fruits, RT-PCR

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Přehled literatury (literární rešerše)	10
3.1 Peckoviny	10
3.2 Choroby peckovin	12
3.3 Rostlinné viry	14
3.4 Princip přenosu virů	15
3.5 Diagnostické metody	16
3.6 Taxonomické zařazení vybraných virů	21
3.6.1 Rod <i>Foveavirus</i>	21
3.6.1.1 Latentní virus meruňky (<i>Apricot latent virus</i> , ApLV)	22
3.6.2 Rod <i>Capillovirus</i>	23
3.6.2.1 A virus třešně (<i>Cherry virus A</i> , CVA)	23
4 Materiál a metody	26
4.1 Pěstování pokusných rostlin	26
4.2 Inokulace rostlin	26
4.3 Izolace totální RNA	28
4.4 Stanovení integrity RNA	32
4.5 Reverzní transkripce (RT)	33
4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	34
4.7 Elektroforetická separace nukleových kyselin	34
4.8 Studium rozšíření virů v České republice	35
5 Výsledky	36
6 Diskuze	38
7 Závěry a doporučení	40
8 Seznam literatury	41
9 Přílohy	46

Seznam použitých zkratek

A₂₆₀, A₂₈₀ – absorbance RNA při 260/280 nm

ApLV – latentní virus meruňky

bp – počet párů bází (v molekule nukleové kyseliny)

cDNA – komplementární DNA

CP – obalový protein

CVA – A virus třešně

ddH₂O – dvakrát destilovaná voda

DEPC – diethylpyrokarbonát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – neoxynukleosid trifosfát

EDTA – etylen-diamino-tetraoctová kyselina

ELISA – imunosorbentní enzymová reakce

HEPES – hydroxyetylpiiperazin ethansulfonová kyselina

kbp – tisíc párů bází

kDa – kilodalton

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

ORF – otevřený čtecí rámeček

PCR – polymerázová řetězová reakce

PVP – polyvinylpyrolidon

RNA – ribonukleová kyselina

RT – reverzní transkripce

SDS – dodecylsírán sodný

TAE – tris acetát EDTA (pufr)

TBE – trisborát EDTA (pufr)

Tris – tris hydrometyl aminometan

1 Úvod

Díky klimatickým podmínkám se v České republice vyskytuje poměrně značné množství patogenů, přičemž podmínka prevence jejich výskytu a negativního působení na pěstovaných rostlinách spočívá ve znalosti jejich biologických vlastností.

O většině patogenů máme dostatečné množství informací, na našem území se vyskytují značnou dobu a díky četným výzkumům lze odhadovat prognózy jejich výskytu, úroveň rozšíření a míru škodlivosti. Existují různé metody ochrany proti nim, jak fyzikální a chemické, tak mechanické a biologické. V posledních letech však i zde dochází k objevům takových organismů, u nichž se nepředpokládalo, že by se mohly v našich podmínkách vyskytnout, případně dlouhodobě udržet a metody ochrany proti nim nejsou zatím stanoveny.

Samostatnou kapitolu pak tvoří rostlinné viry – skupina organismů, u níž doposud nejsme schopni určit její původ ani její životnost. Metody ochrany proti virům spočívají v prevenci jejich výskytu, zejména v užívání rezistentních či tolerantních odrůd. Za touto metodou však stojí velké úsilí a možnosti jsou kvůli nedostatečné znalosti principu funkce virových částic omezené.

Mezi nově objevené viry, u nichž se dá předpokládat rozšíření jejich výskytu i na naše území patří latentní virus meruňky (*Apricot latent virus*, ApLV) a A virus třešně (*Cherry virus A*, CVA). Tyto viry jsou v současné době velmi málo prozkoumané a navíc ztěžují možnosti výzkumu častou latencí projevů na velké části svých hostitelů. Přestože doposud nebyla stanovena jejich ekonomická škodlivost, předpokládá se, že by mohly stát za snižováním výnosů ovoce a za zhoršováním růstových vlastností pěstovaných rostlin, a tudíž by bylo vhodné se jimi více zabývat.

V průběhu roku 2009 a začátkem roku 2010 tedy proběhla tato studie, mající za úkol seznámení se se základními principy virologie, práce s rostlinným materiálem a užívání biologických a molekulárně – genetických metod vedoucích k detekci zkoumaných virů. Majorita pokusu měla návaznost na předchozí práce v oblasti této problematiky na Katedře ochrany rostlin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo zkoumání okruhu bylinných hostitelů latentního viru meruňky a A viru třešně a monitoring rozšíření těchto patogenů v České republice. Níže následují jednotlivé body práce:

- vypěstování bylinných hostitelů
- různé způsoby inokulace bylin virovými patogeny
- sledování případných symptomů na infikovaných rostlinách
- výběr vhodné metody izolace celkové RNA
- detekce virů v rostlinách za pomoci geneticky-molekulárních metod
- monitoring rozšíření virů odběrem rostlinného materiálu v ovocných sadech a jeho následným zpracováním

3 Přehled literatury (literární rešerše)

3.1 Peckoviny

V České republice má pěstování ovocných stromů dlouholetou tradici a těší se značné oblibě. Podle situační a výhledové zprávy ministerstva zemědělství z roku 2009 dosahovala výměra ovocných sadů celkem 21 738 hektarů, z čehož 17 713 hektarů činí produkční sady. Velkou část tvoří peckoviny, nejpěstovanějšími druhy jsou višně (1772 ha), dále meruňky (1334 ha), poté slivoně a švestky (1254 ha), následně třešně (876 ha) a broskvoně (832 ha). Nejvýznamnější část těchto sadů se nachází na jižní Moravě. Počty stromů jednotlivých druhů přesahují hranici jednoho a čtvrt milionu. Průměrné výnosy v tunách na hektar činí u višně 4,05, u meruněk 3,69, u slivoní a švestek 4,71, u třešní 3,78 a u broskvoní 4,29 (ANONYM 1).

Plody peckovin jsou jednosemenné peckovice s dužnatým oplodím. Výjimku tvoří mandlovník se suchým oplodím bez šťávy. Rozlišujeme tři základní skupiny: peckoviny se slupkou neojíněnou (třešeň, višeň, mahalebka), peckoviny se slupkou ojíněnou (slivoně- švestky pravé, pološvestky, slívy, renklódy a mirabelky) a peckoviny se slupkou plstnatou (meruňky, broskvoně, mandloně) (Blažek et al., 1998). Z výše jmenovaných dřevin mezi původní domácí druhy patří pouze švestka obecná, třešeň ptačí a višeň turecká (mahalebka) (Mezera & Hísek, 1989), všichni zástupci pak spadají pod čeleď růžovitých (*Rosaceae*) (Kremer, 1984). V další části této kapitoly následuje bližší charakteristika vybraných, nejčastěji pěstovaných druhů.

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.)

Třešeň ptačí je výchozím typem četných odrůd kultivovaných nejen kvůli plodům, ale také jako okrasné dřeviny. V Evropě je velmi rozšířená v křovinách a smíšených lesích a od zplněných třešní je těžko rozlišitelná. Kvete v dubnu až květnu. Rozlišujeme dva základní okruhy forem – třešně chrupky (*P. avium* var. *duracina*) a třešně srdcovky (*P. avium* var. *juliana*) (Kremer, 1984). Pro pěstování třešní jsou vhodné sušší oblasti, neboť při častějších deštích jsou sklizně znehodnocovány praskáním plodů. Vhodné jsou lehčí a propustné půdy a teplá, slunná stanoviště (Blažek et al., 1998).

Višeň obecná (*Prunus cerasus* L.)

Původ tohoto druhu je v jihovýchodní Asii, v Evropě nacházíme mnoho kultivovaných odrůd, které místy zplaňují. Ke zdomácňování docházelo zejména v oblasti Středomoří. Kvete v dubnu až květnu. K nejznámějším odrůdám patří morelka stinná (*P. cerasus* var. *austera*), višeň amrhele (*P. cerasus* var. *caproniana*), višeň vajksle (*P. cerasus* var. *frutescens*) a višeň maraše (*P. cerasus* var. *marasca*) (Kremer, 1984). Co se klimatických podmínek týče, višeň patří k nejméně náročným druhům a snáší téměř všechny půdy až na vyloženě těžké a jílovité (Blažek et al., 1998).

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.)

Vysoký keř nebo malý strom dosahující výšky 6-10 m má původ v centrální Asii a v Číně. Již celá staletí je však kultivována, přibližně v prvním století našeho letopočtu se dostala z centrální Asie přes Írán a Arménii do Středomoří, kde je dnes zastoupena četnými kultivary. Meruňka je způsobilá k vysazování i v severní části Evropy, ale nemohla zde zdomácňet a proto také nezplaňuje. Kvete v březnu až dubnu (Kremer, 1984). Meruňky byly geneticky utvářeny v oblastech kontinentálního klimatu s tuhými a krátkými zimami a s rychlým přechodem do jara. Proto v našich podmínkách od druhé poloviny prosince přetrvávají v tak zvaném „vynuceném zimním klidu“ a pro úspěšné pěstování je třeba volit stanoviště s co největší eliminací negativních vlivů klimatu – teplejší oblasti, mírně svažité terén a bohaté půdy s vyšším obsahem draslíku (Blažek et al., 1998).

Broskvoň obecná (*Prunus persica* (L.) BATSCH)

Přesný původ této dřeviny není znám, ale předpokládá se, že se do Středomoří a střední Evropy rozšířil z Číny či z centrální Asie. Květy se objevují po 1-2 a už před rašením listů se plně rozvíjejí. Broskvoň kvete v březnu až v květnu (Kremer, 1984). Vhodné tepelné podmínky pro pěstování broskvoně jsou ohraničeny izotermou 9 °C, průměrnou vegetační teplotou 16-17 °C a roční sumou teplot 2600 – 2900 °C. Proto je výsadba doporučována jen v teplých oblastech státu (u nás Jižní Morava, Polabí) (Blažek et al., 1998).

Kvůli teplomilnosti většiny zástupců často dochází k výskytu chorob, z nichž některé jsou uvedeny v další kapitole.

3.2 Choroby peckovin

U peckovin patří mezi nejdůležitější choroby šarka a dále lze nalézt rakovinné odumírání větví, moniliová hniloba plodů a spála, apoplexie meruňky, kadeřavost broskvoně aj. Zde následuje krátký popis chorob.

Šarka

Tato velmi závažná choroba, která téměř znemožňuje pěstování náchylných odrůd švestek a značně snižuje výnosy i životnost meruňek a broskvoní, je způsobena virem šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) (Kazda et al., 2003). Masově se rozšířila během roku 1957, pravděpodobně díky dovozu nemocných stromků z balkánských států (Zacha, 1988). Na listech švestky se projevuje vznikem difúzních chlorotických skvrn či kroužků s případnou možností nekrotizace (Kazda et al., 2003). Listy však nemění tvar. Na plodech dochází k vytvoření propadlých skvrn (označovaných jako neštovice švestky), příznaky se stupňují a ve fázi modrání plodů bývá povrch již hrubě rozbrázděn proláklými místy se silnější vrstvou vosku (Zacha, 1988). Dužnina pod narušenou slupkou se barví do červena a na peckách se objevují nepravidelné tmavší skvrny. Plody mají nižší obsah cukrů a předčasně opadávají. Na meruňkových listech jsou projevy shodné s listy švestkovými, avšak skvrny na plodech nejsou propadlé a na peckách se objevují skvrny ve světlejší barvě. Projev na broskvoni je slabší, pouze časně na jaře a v podobě málo patrných světlejších difúzních skvrn na listech. Kromě školkařského materiálu se virus šíří neperzistentním přenosem mšicemi a jediným vhodným opatřením je pěstování tolerantních či částečně rezistentních odrůd (Kazda et al., 2003). Výskyt projevů na napadených stromech podporuje suché a teplé počasí, hostiteli viru mohou být také divoké ovocné stromy, nejhojněji trnka. Choroba se vyskytuje v nížinách i vyšších polohách a pronikla i do oblastí na sever od našeho území (Zacha, 1988).

Rakovinné odumírání větví

Tato velmi rozšířená škodlivá choroba postihující třešně, višně, meruňky a broskvoně je nejčastěji způsobena bakterií *Pseudomonas syringae*. Napadení větví se projevuje klejotokem a výskytem tmavých skvrn nejčastěji v blízkosti ran po řezu, na ulomených větvičkách nebo v místě větvení. Část větve nad napadením buď náhle usychá, nebo postupně odumírá. Infekce je šířena deštěm, větrem či případně hmyzem. Horší

zdravotní stav rostliny způsobený například řezem nebo mrazem zvyšuje možnost napadení (Kazda et al., 2003).

Moniliová hniloba plodů a moniliová spála

Tato velmi častá a ekonomicky závažná choroba má houbový původ (*Sclerotinia* resp. *Monilinia laxa*) (Kazda et al., 2003). Projevuje se měkkou hnědou hnilobou, která rychle pokračuje zvláště za teplých letních dnů, dále tvorbou koncentrických kruhů konidioforů soustředěných okolo místa vniknutí patogena do rostliny a následnou mumifikací plodů. Někdy může dojít k nakažení květů a prorostením skrz stopky až do dřeva větví, díky čemuž letorosty napadených rostlin vadnou a usychají (Zacha, 1988). Napadené plody, které jsou zdrojem infekce dále šířené větrem a hmyzem, je vhodné likvidovat, stejně tak jako napadené letorosty. Je možno provádět chemickou ochranu aplikací přípravků buď na květy a plody nebo z důvodu eliminace škůdců na plodech (Kazda et al., 2003).

Apoplexie meruňky

Tato velmi rozšířená a škodlivá choroba má více původců (*Monilinia laxa*, *Clasterosporium carpophilum*, *Leucostoma* spp., *Verticilium* spp., *Pseudomonas syringae* aj.) (Kazda et al., 2003). Namrznutí pletiv vytváří dispoziční podmínky pro průnik patogenů do rostliny a následně dochází k rozkladu vodivých pletiv v kmeni či větvi, jež bývá doprovázeno vadnutím a odumíráním. K apoplexii (či také mrtvici) meruňek může dojít kdykoliv – od konce zimy až do druhé poloviny léta, někdy přichází i těsně před dozráním ovoce. Náchylnost bývá někdy vázána na použitou odnož, riskantní je zejména myrobalán. Je tedy vhodnější využívat šlechtění na slívách či přímo na meruňkových semenáčích. Dalšími vhodnými kroky je chránění rostlin před mrazem a volba adekvátního stanoviště (Zacha, 1988).

Kadeřavost broskvoně

Tato velmi častá a závažná choroba ovlivňující výnos i mrazuvzdornost stromů je způsobena houbovým patogenem *Taphrina deformans*. Při napadení dochází k deformaci listů, jejich zkadeření, zmasitění a zabarvení do žluta či červena. Později napadená místa tmavnou, nekrotizují a listy předčasně opadávají (Kazda et al., 2003). Po opadu sice dojde k vyrašení nových listů, nicméně ty již nedokáží zajistit výživu

plodům a ty opadají. Navíc se prodlouží vegetační doba rostliny a hrozí její snadné namrznutí během zimy (Zacha, 1988). Méně často dochází k napadení i samotných plodů, které také způsobuje deformace a barevné změny. Přenos spor je umožněn větrem, na větvích v podobě blastospor patogen přezimuje. Vhodnou ochranou je chemický postřik v předjaří (Kazda et al., 2003).

Další onemocnění peckovin způsobená viry

V našich podmínkách je výskyt dalších viróz peckovin méně častý, nicméně z širšího hlediska mezi důležité choroby na peckovinách způsobené viry patří také:

- nekrotická kroužkovitost, kterou způsobuje *Prunus necrotic ringspot virus* (NRSV) a projevuje se tvorbou chlorotických skvrn na listech. Napadené pletivo zasychá a v konečné fázi vypadává z listů (Uyemoto & Scott, 1992).
- zakrslost broskvoní, kterou způsobuje kombinace předchozího viru společně s *Prune dwarf virus* (PDV). Napadení mladých stromků se projevuje retardací vzrůstu (Uyemoto & Scott, 1992).
- napadení listů, plodů i kmene, které způsobuje *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), k jehož projevům patří kupříkladu tmavé propadlé skvrny či světlé kroužky na listech broskvoně, propadlé skvrny na plodech třešní a višní nebo inkompatibilita při roubování meruněk (Diekmann & Putter, 1996).
- zkroucení listů, které způsobuje *Cherry leaf roll virus* (CLRV) a ačkoliv výraznější škody tento jsou známy spíše u ořešáků, u třešně může oddálit kvetení a někdy dokonce způsobit odumření celé rostliny (Diekmann & Putter, 1996).

3.3 Rostlinné viry

Virus lze obecně popsat jako množinu jedné či více molekul genomických nukleových kyselin, běžně uzavřených v ochranném obalu z proteinů (případně někdy i z lipoproteinů), které jsou schopny si zprostředkovat svou vlastní replikaci pouze ve vhodných hostitelských buňkách. V těchto buňkách je replikace viru jednak závislá na hostitelském aparátu syntetizujícím proteiny, využívá raději poolů s potřebnými látkami nežli duálního štěpení a probíhá v místech, která nejsou od hostitelské buňky oddělena lipoproteinovou dvouvrstvou. Nukleová kyselina viru může být tvořena jedno nebo

dvouvláknitou DNA či RNA, přičemž jednovláknité nukleové kyseliny mohou být pozitivní nebo negativní. Pozitivní chápeme u virů tak, že sekvence, která aktuálně kóduje protein, slouží jako mRNA. Negativní znamená komplementární sekvenci. Genom rostlinných virů je velikostně na menším konci virového spektra, neboť kóduje pouze 1 až 12 proteinů. Další funkcí proteinů, kromě ochranného obalu může být zprostředkování pohybu mezi hostitelskými buňkami, umožnění přenosu bezobratlými nebo houbovými vektory, nebo přizpůsobení aktivity proteáz k specifickému štěpení dlouhého virového polyproteinu na funkční produkty. Replikace mnoha druhů virů se indukovaně odehrává v oblasti buněčné cytoplazmy nazývané viroplazma. Některé viry navíc vyžadují přítomnost dalších virů pro replikaci (jak je tomu v případě satelitních virů) či pro umožnění přenosu bezobratlými (uskutečnění díky helper virům). Doposud nebyl nalezen žádný rostlinný virus, který by s nevirálními nukleovými kyselinami sdílel schopnost být začleněn do genomu hostitelské buňky (Matthews, 1992).

3.4 Princip přenosu virů

Základní infekční proces má za následek vstup viru do rostliny přes mechanické poranění, často způsobené vektorem, případně jiným vnějším poraněním, avšak přenos může být uskutečněn také semeny či pylem (Dickinson, 2003).

Kvůli pevnosti buněčné stěny většina virů využívá pomoci vektorových organismů, jakými jsou bezobratlí, houby a členovci (Khan & Dijkstra, 2006). Nejznámější zástupci spadají do třetí skupiny. Pro přenos nejpočetněji zastoupený řád stejnokřídlých (Homoptera) obsahuje čeledi molicovitých (Aleyrodidae), mšicovitých (Aphididae), křískovitých (Cicadellidae), či červcovitých (Pseudococcidae). Nejznámějším vektorem je mšice. Zde může být přenos označen jako neperzistentní (v případě že virus zůstává zachycen pouze na styletu přenašeče), semi-perzistentní (v případě zachycení viru na předním střevě) a perzistentní (virus se dostává do hemolymfy a slinných žláz) (Dickinson, 2003). V prvních dvou případech lze mluvit o přenosu necirkulativním, v posledním případě se jedná o přenos cirkulativní. U cirkulativního přenosu může dojít navíc k multiplikaci viru v těle přenašeče, jak je tomu u propagativních virů (Astier et al., 2007).

Po vstupu do rostlinné buňky může dojít k dekapidaci a následnému obalení RNA ribozómy, které nahradí obalový protein a ochrání tak informaci před rozložením nukleázami. Poté dojde k expresi genů kódujících nukleovou kyselinu, ve výsledku se

genom zreplikuje a dojde k tvorbě virových proteinů zodpovědných za patogenitu. Výsledný genom je zabudován do ribonukleoproteinových komplexů a šíří se dále do rostliny (Dickinson, 2003). Od buňky, jež byla infikována jako první, se virus šíří lokálně do sousedních buněk a poté do vaskulárního systému, umožňujícím plné systematické rozšíření do vzdálených rostlinných částí (Hull, 2009). Transport viru se dá rozdělit do dvou skupin. První, pomalejší, je transport na krátkou vzdálenost, čili z buňky do buňky. Při pohybu mezi buňkami a buněčnými stěnami (epidermis, mezofyl, cévní parenchym) je využíváno přirozených otvorů, plasmodesmat, jejichž omezený průměr je virus schopen rozšířit za pomoci pohybových proteinů. Plasmodesmaty prochází desmotubuly, cylindrické součásti endoplasmatického retikula, nicméně těchto příliš úzkých kanálů virus nevyužívá a prospekává se podél nich. Pohybové proteiny jsou často univerzální, nikoliv specifické pro jeden virus a jsou součástí proteinu obalového. Pro krátký přesun se využívá jádro obalového proteinu a CI helikáza, zatímco pro transport na dlouhou vzdálenost se využívají VPg HC-Pro pomocné komponenty z N- a C- terminální oblasti obalového proteinu. Jakmile virus překoná tyto překážky a vstoupí do floému, může se již rostlinou pohybovat druhým, rychlejším způsobem, společně s fotoasimiláty (Dickinson, 2003).

3.5 Diagnostické metody

Existuje několik metod umožňujících detekci viru v rostlinném materiálu. Nejsnáze se jeví diagnostika na základě symptomů se ovšem ve většině případů ukazuje jako nedostatečná, neboť většina virů má na svědomí produkci obecných symptomů, jakými jsou chlorózy, mozaiky či žloutenky, které mohou být způsobeny mnoha různými faktory. Proto se častěji používají molekulární metody (Vidhyasekaran, 2007). V souvislosti s ApLV a CVA je navíc třeba poukázat na fakt, že jejich projevy jsou ve většině případů latentní a vyvozování závěrů na základě symptomů je nedostačující. Mezi nejběžnější možnosti detekce virů patří biologické metody (mechanická inokulace, roubování) a dále pak molekulární metody: sérologické (imunoprecipitační a imunodifúzní metoda, ELISA), detekce za pomoci elektronového mikroskopu, či využití detekce virových nukleových kyselin za pomoci molekulární hybridizace nebo polymerázové řetězové reakce (Astier et al., 2007).

Biologické metody

Jedná se o analýzu symptomů vytvářených na testovacích rostlinách, které byly inokulovány za kontrolovaných laboratorních podmínek. Projevy mohou být jak systemické, tak pouze lokální, striktně omezené na inokulovaný list. Lokální reakce, chloróza či nekrotické léze mohou být pozorovány záhy – již za 2 až 7 dní po inokulaci. Systemická reakce se projeví nejdříve po týdnu, mnohdy později. Počet lokálních lézí závisí na koncentraci infekčních virových částí v inokulu.

Tyto metody se souhrnně těší značné oblibě díky své univerzálnosti (diagnostika nejen virů, ale i viroidů či fytoplazem) a schopnosti zabývat se i charakterizací patogenity (patotyp, závažnost symptomů), a to i přes nevýhody v podobě časové náročnosti, potřebě udržování skleníkových prostor bez případných hmyzích vektorů a obtížné interpretaci výsledků v případě směsné infekce některými viry (Astier et al., 2007).

V některých případech se ovšem ani v hostitelských rostlinách nemusí virus projevit, kupříkladu byl-li zvolen slabý virový kmen, listy byly nevhodného stáří či v nevhodné pozici na rostlině, případně byl zvolen tolerantní hostitel (Matthews, 1992).

Mechanická inokulace

Jedná se o nejčastěji využívanou metodu inokulace. Využívá se faktu, že některé byliny (*Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*) jsou náchylné na více než sto rozdílných virů a mohou být využity jako téměř univerzální hostitelé (Astier et al., 2007). Jako vnímavé čeledi jsou jmenovány *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae* (*Fabaceae*) a *Solanaceae* (Khan & Dijkstra, 2006). Pro dosažení vysoké citlivosti se rostliny předpěstovávají v kontrolovaných podmínkách skleníku a k experimentům se využívají mladší rostliny. Pro inokulaci jsou odebírány rostliny ve fázi děložních listů (jako je tomu například u okurky), či ve fázi 4-6 pravých listů (merlík, tabák) (Astier et al., 2007). Velmi významnou roli hraje věk inokulované rostliny. Může nastat situace, při které po inokulaci svrchních listů infekce nepronikne do listů spodních pater. S přibývajícím věkem roste tendence vzniku pouze lokálních infekcí (Matthews, 1992).

Na povrch listů je pak nanášen hrubý homogenát získaný rozmělněním infekčního materiálu s příslušným puftrem (většinou fosfátovým) v třecí misce s tloučkem (Astier et al., 2007). Některé dřeviny z čeledi *Rosaceae* obsahují taniny. Tyto sekundární

metabolity se mohou nevratně navázat na virové částice a učinit je neinfekčními. Preventivně je tedy do macerátu s taniny dodávána viru konkurenční složka, například kofein, vaječný albumin prášek z kůže či nikotin (Khan & Dijkstra, 2006). Inhibiční efekt pro inokulaci mohou způsobovat i jiné látky, jako jsou například polyfenoly či polysacharidy a i tyto složky je vhodné eliminovat přídatnými látkami (Matthews, 1992). Samotné nanesení inokula je prováděno stěrkou, houbičkou nebo pouhým prstem v gumovém návleku či rukavici. Virus snadno proniká do rostliny přes narušenou epidermis nebo žláznatý trichom (Astier et al., 2007). Cílem mechanické inokulace je způsobit četná drobná poranění na povrchu listu, avšak nezpůsobit přitom smrt buněk (Matthews, 1992). K usnadnění penetrace může být použit brusný materiál, kupříkladu karborundum. Následně je doporučeno list okamžitě opláchnout a celou rostlinu přemístit nazpět do skleníku a dopřát jí podmínky vhodné k namnožení viru a projevení symptomů, tedy dodat odpovídající světlo a teplotu okolo 20-25 °C (Astier et al., 2007). Mechanická inokulace však nemusí být vždy účinná. Ačkoliv teoreticky stačí jediná virová částice ke vzniku infekce, v reálu je potřeba virových částí mnohem více, někdy i nad 500. Poranění epidermální vrstvy nemusí být dostatečné k proniknutí viru do cytoplasmy (Dijkstra & de Jager, 1998).

Inokulace roubováním

Naroubování infekčního materiálu na indikátorovou rostlinu je velmi starou metodou. Této metody je využíváno při studiu virů, které nejsou přenositelné jinými metodami (například jsou vázány na floém), jsou vysoce nestabilní, nebo pro ně není znám žádný biologický vektor (Khan & Dijkstra 2006). Stejně tak slouží při studiu virů s nedostatečně prozkoumanou etiologií. Pro schopnost vytvoření dobrých a rychlých projevů jsou využívány ovocné dřeviny, případně réva vinná. Symptomy se projeví v období několika měsíců až roku (Astier et al., 2007). Nejčastěji jsou využívány pupeny a očka, také je možné naroubovat cibule a hlízy (Khan & Dijkstra, 2006).

Sérologické metody

Sérologické techniky využívají specifickou reakci mezi dvěma typy proteinů – mezi antigenem (protein virového původu) a protilátkou (proteinem specifickým pro daný antigen), která se vytváří v těle živočichů jako odezva po naočkování antigenem. Virové proteiny jsou rozpoznávány za pomoci determinant, epitopů. Protilátky jsou proteiny ze skupiny imunoglobulinů (Ig), které se nacházejí v krevním séru. Imunoglobuliny jsou

rozděleny do pěti skupin, přičemž IgG tvoří tři čtvrtiny z jejich celkové produkce. Protilátky mohou být polyklonální či monoklonální, dle počtu epitopů, na něž se váží (Astier et al., 2007).

Imunoprecipitace a imunodifúze

Tyto metody stály na počátku sérologických testů užívaných v rostlinné virologii. Když se extrakt z virózních listů smísil se sérem obsahujícím specifické protilátky, vznikaly početné nerozpustné agregáty, neboť protilátky reagovaly s velkým počtem identických obalových proteinů. Imunoprecipitační reakce tedy byla nastavena tak, aby se objevila pouze v případě, kdy je relativní koncentrace viru a protilátek v rovnováze.

Zatímco precipitace můžeme docílit v kapalném médiu na skleněné destičce, v testovacích trubičkách nebo v Petriho miskách, pro techniku imunodifúze je třeba použít agarového gelu. Po nanesení protilátky do středové jamky se antigen nanese do periférních jamek. Při reakci se pak vytvoří viditelná bílá precipitační linie (Astier et al., 2007).

ELISA

Tato metoda není založena na přímém sledování vzniku reakce antigen-protilátka, ale reakci odhaluje označením imunoglobulinů enzymy, vytvářejícími zabarvení. Nejčastěji užívanou formou je DAS-ELISA (double antibody sandwich), kdy je antigen v jamce umístěn mezi dvěma vrstvami specifických protilátek (Aster et al., 2007). První vazba se vytvoří po navázání antigenu na protilátku, jíž je potažené dno a stěny jamky. Pro vytvoření druhé vazby je využívána protilátka vybavená již zmíněným enzymem a bezbarvý komplex se s přibývajícím časem začne zabarvovat. Tím se liší od jamek, v nichž k reakci nedošlo.

Intenzita barvy se následně měří za pomoci spektrofotometru (Astier et al., 2007).

Metody založené na bázích nukleových kyselin

Tyto technologie, často využívané pro diagnostiku chorob plodin, využívají vysoce specifické komplementarity bází (adenin-thymin, guanin-cytosin). Interakce mezi dvěma jadnovláknitými molekulami se nazývá hybridizace. Vazby vodíkovými můstky, díky nimž drží pohromadě dvě vlákna DNA, je možné rozvolnit denaturací, například nastolením vysokých teplot nebo docílením silně alkalického prostředí. Upravením

fyzikálních podmínek pak může dojít k nasedávání vláken k sobě. Tímto způsobem lze vytvořit nejen spojení vláken dvojic DNA: DNA, ale také DNA:RNA či RNA:RNA díky vazbě adeninu s uracilem. Jednovláknitá DNA i RNA mohou díky nukleotidové sekvenci sloužit jako sondy a mohou v rámci selektivní hybridizace komplementárně vyhledat patogenní DNA ve vzorku (Vidhyasekaran, 2007).

Reverzní transkripce (RT)

Reverzní transkripce je jedním z předchozích kroků pro konvenční PCR a je užívána pro detekci jednovláknité virové RNA. Využívá se specifického virového primeru, díky němuž se vytvoří cDNA kopie RNA.

Díky RT lze určit vývojovou fázi patogena v infikovaném materiálu a potenciální využití je také v diagnostice bakteriálních a houbových patogenů. Taktéž je možné poupravit nedostatečnost běžné PCR, díky jejíž citlivosti lze amplifikovat DNA z neživotaschopného organismu, nebo ze sekundárního vetřelce, který nemusí mít s chorobou nic společného (Dickinson, 2003).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Výhodou této metody je její rychlost a snadná využitelnost v terénních laboratořích. Kromě termocykleru, náčiní pro gelovou elektroforézu a systému pro vizualizaci výsledků (UV transiluminátor a fotoaparát) je zapotřebí hlavně vhodného enzymu. Technologicky je využíváno oligonukleotidových primerů, jejichž sekvence vyhovuje k diagnostice patogena.

Existuje mnoho metod založených na PCR, které byly vytvořeny pro vyšší hodnověrnost, výkonnost a pro snížení ceny reakce. Velmi užitečná je kupříkladu možnost identifikace vektoru u chorob přenášených hmyzem. Zde je ovšem třeba uvážit existenci silných inhibitorů Taq polymerázy, které obsahuje rostlinná buňka, stejně tak, jako vzorky půdy nebo hmyzu. Tyto látky je třeba odstranit a přesvědčit se, že nestojí za negativními výsledky reakce. Popřípadě k ověření citlivosti reakce lze využít metodu nested PCR, kdy je primární produkt zředěn a umístěn do druhé reakce s dalšími adekvátními primery. Je také možné detekovat ve vzorku více než jednoho patogena za pomoci 'multiplex' PCR, kdy je díky kombinaci primerů dosaženo namnožení více fragmentů rozdílných délek (Dickinson, 2003).

3.6 Taxonomické zařazení vybraných virů

Podle aktuálního zařazení korespondujícího s virologickou nomenklaturní společností ICTV se druh ApLV nachází v rodě *Foveavirus* a druh CVA v rodě *Capillovirus*, přičemž oba tyto rody spadají do čeledi *Betaflexiviridae* v řádu *Tymovirales*. Předchozí zařazení obou druhů původně náleželo do čeledi *Flexiviridae*, jejíž popis a vnitřní rozčlenění vešlo ve známost v roce 2004 (Adams et al., 2004). Řád *Tymovirales* v současné době zahrnuje tyto čtyři čeledi: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae* a *Tymoviridae*. V čeledi *Betaflexiviridae* se pak nalézají rody *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* a šest doposud nepřirazených druhů (ANONYM 2).

3.6.1 Rod *Foveavirus*

Rod *Foveavirus* byl poprvé popsán již v roce 1998 (Martelli & Jelkmann, 1998), nicméně tou dobou do něj latentní virus meruňky ještě nebyl zařazen. O vysoké homologii nukleotidových sekvencí a z nich vyvozených aminokyselin obalového proteinu s již dříve zařazeným *Apple stem pitting virus* (ASPV) se sice zmiňuje studie z téhož roku (Nemchinov & Hadidi, 1998), nicméně k definitivnímu zařazení došlo až o dva roky později (Nemchinov et al., 2000).

Dnes rod obsahuje čtyři druhy, kterými jsou *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apricot latent virus* (ApLV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV) a *Peach chlorotic mottle virus* (PCMV).

Jejich společným prvkem je vláknitý tvar virionů s délkou 800-1000 nm a průměrem 12-15 nm. Mají spirálovitou symetrii a povrchový vzor podélných či křížených čar. Genom tvoří jednovláknitá pozitivní RNA s délkou 8,7-9,3 kb složená z pěti otevřených čtecích rámců, kódujících proteiny spojené s replikací (ORF 1), movement proteiny (ORF 2 až 4) a obalový protein (ORF 5). Jednotky tvořící obalový protein (CP) jsou jednoho typu a jejich délka je 28-44 kDa. Hostitelský okruh je tvořen buď jediným druhem, nebo několika málo druhy. Není znám žádný vektor, viry jsou přenosné roubováním a po mechanickém přenosu se i přes jisté obtíže hostitelem může stát *Nicotiana occidentalis* a jeho poddruh *obliqua*. Zeměpisné rozšíření je poměrně široké (Adams et al., 2004).

3.6.1.1 Latentní virus meruňky (*Apricot latent virus, ApLV*)

Latentní virus meruňky (ApLV, dříve též ALV) byl popsán v roce 1993. K jeho identifikaci došlo v Moldávii na bezpříznakové rostlině meruňky kultivaru Silistra N4, jež byla přivezena z Bulharska. Na listech infikovaných broskvoňových semenáčů pak tento virus způsoboval výskyt žlutě-zelených skvrn. Při inokulaci bylinných hostitelů se symptomy na listech objevily u dvou klonů tabáků *Nicotiana occidentalis*, konkrétně u *Nicotiana occidentalis* B37, kde se jednalo o prosvětlování žilek a u *N. occidentalis* ssp. *obliqua* N1, kde se počaly rozvíjet nekrózy (Zemtchik et al., 1998). Studie z téhož roku uvádí, že chlorotické skvrny lze pozorovat i na *Prunus cerasifera* infikované virozním očkem, ale hlavně poskytuje důležitou informaci o osekvenování fragmentálního úseku ApLV (1444 nt). Ten obsahuje zaprvé data o CP, 5' oblast (1-651 nt), která se výrazně liší od genomu ostatních rostlinných virů a zadruhé data o 3' NCR oblasti, čili úseku, ve kterém neprobíhá translace (652-1442 nt), která prokazuje 77 % identičnost s genomem ASPV (Nemchinov & Hadidi, 1998).

Opakování pokusu naočkování broskvoně GF 305 palestinským meruňkovým očkem z kultivaru Mistikawi v Itálii přineslo četné výsledky nejen v podobě výskytu prosvětlení žilek a výskytu lokálních nekrot na inokulovaných listových čepelích testovaných tabáků *N. occidentalis*, ale také vznikem červených až fialových kroužků a skvrn na třešňových kultivarech Bing, Canindex a Sam a dokonce objevením vláknitých virových částic, později potvrzených právě jako ApLV. Po první detekci viru v jižním Středomoří (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2005), následovaly další výzkumy a rok později byl výskyt potvrzen také v Egyptě (Maghraby, 2006), rok poté v turecké západní Anatolii (Gumus et al., 2007) a v Libanonu (Jarrar et al., 2007) a doposud nejnovější výskyt byl potvrzen ve Španělsku (García-Ibarra et al., 2010).

Kompletní genom tohoto viru nebyl doposud osekvenován a viru nebyla přiřknuta žádná z chorob, vyskytujících se u peckovin.

Na základě podobnosti symptomů se objevila teorie poukazující na možnost blízkého vztahu mezi latentním virem meruňky a broskvoňovými chorobami peach asteroid spot disease (PAS) a peach sooty ringspot disease (PSRS), což jsou choroby neznámého původu, které se na broskvoni objevily po naočkování meruňkovým štěpem. Zkoumané napadené rostliny obsahovaly RNA strukturu, s podobnou mobilitou, jako jeví nukleová kyselina latentního viru meruňky při průchodu gelem během elektroforézy. Částečná

sekvence úseků proteinů broskvoňových kultivarů LA2 (PAS) a Caserta 12 (PSRS) byla identická s ApLV z 96 % a z 97 % (Gentit et al., 2001a), nicméně jiná studie uvádí, že označení ApLV jako původce PAS je pouze diskutabilní (Rao et al., 2008). Další vysvětlení nabízí také objevení úseku neznámé RNA, který byl vyizolovaný z broskvoně kultivaru Caserta 12 a byl ze 78 % homologní se sekvencí ApLV. Závěr experimentu uvádí možnost existence dvou odlišných variant ApLV (Gentit et al., 2001b).

Další nečekané výsledky přineslo také testování ApLV na jiných dřevinných hostitelích. Symptomy se projevily nejen na očkovaných rostlinách broskvoně cv. Missouri, ale poprvé také na samotné meruňce, a to u cv. Tyrinthos a cv. Haward. Na rozdíl od broskvoní se však symptomatické skvrny objevily nikoliv na jaře, ale až v pokročilém létě, tedy konkrétně v srpnu (Jarrar, 2005). Vznik symptomů na cv. Tyrinthos potvrdila i další studie, která rozšířila okruh dřevinných (ač ne vždy symptomatických) hostitelů ApLV až na 33 zástupců rodu *Prunus* kultivary druhů *Prunus persica*, *P. avium*, *P. armeniaca*, *P. domestica* a *P. salicina* (Grimová et al., 2010).

3.6.2 Rod *Capillovirus*

Rod *Capillovirus* obsahuje pouze dva druhy, jimiž jsou *Apple stem grooving virus* (ASGV) a *Cherry virus A* (CVA).

Viriony mají pružný vláknitý tvar, rozměry 640-700 x 12 nm a spirálovité uspořádání proteinových podjednotek. Genom je tvořen jednovláknitou pozitivní RNA velikosti 6,5-7,4 kb, a je složen ze dvou otevřených čtecích rámců. Obalový protein je tvořen jedním typem podjednotek a jeho délka je 24-27 kDa. Přirozený hostitelský okruh je tvořen jen několika málo hostiteli. Viry jsou přenosné roubováním, ale není znám žádný vektor. Zeměpisné rozšíření je široké (Adams et al., 2004).

3.6.2.1 A virus třešně (*Cherry virus A*, CVA)

A virus třešně byl prvně popsán v roce 1995 v Německu, přičemž již tou dobou se uvažovalo o jeho participaci v onemocnění peckovin little cherry disease (maloplodost třešně), případně v onemocnění rusty mottle disease (rzivá skvrnitost) a necrotic rusty mottle disease (nekrotická rzivá skvrnitost). Ačkoliv se v mnoha infikovaných rostlinách virus nacházel, výsledky nebyly prokázány za jednoznačné a viru byla přiřknuta latentní forma. Nukleotidová sekvence (7383 nt) byla získaná z cDNA klonů,

přičemž jako templát posloužila dsRNA získaná z rostlin infikovaných virem maloplodosti třešní (LCV), neboť rekombinantní plasmidy jevíly s CVA vysokou specifitu. Organizace genomu, podobná jako u ASGV, sestává z 266 kDa polyproteinového ORF 1 (obsahujícího všechny komponenty proteinu spojeného s replikací a kódujícího 24 kDa CP) a z 52 kDa ORF 2 (umístěného mezi ORF 1 a poly A řetězcem), který jeví vysokou identitu s proteiny domněle zajišťujícími virový transport z buňky do buňky. Při srovnávání s jinými podobnými viry byla dosažena prokazatelná rozdílnost CP. Přestože vláknité částice CVA byly nalezeny ve vzorcích rostlin jevíících tři odlišné choroby, nebyl s žádnou z nich virus spojen (Jelkmann, 1995).

Dále byl virus pozorován v Kanadě, kde byl nalezen dokonce i ve vzorcích meruňky a broskvoně. Na testovaných jedincích *Prunus avium* cv. Bing, Sam, Canindex a F12/1 se po infekci projevílo mnoho chorob (little cherry disease, cherry mottle leaf, rusty mottle, necrotic rusty mottle, green ring mottle, prunus necrotic ringspot, X-disease, a *Prunus serrulata* 'Shirofugen' stunting), ovšem CVA nebyl označen jako původce byť jedné z nich (James & Jelkmann, 1998). V roce 2001 byl virus poprvé detekován také ve Spojeném království (Kirby & Adams, 2001), kde ze šestnácti odebraných třešňových listů bylo patnáct pozitivních. O tři roky později byla detekce nahlášena v Japonsku (Isogai et al., 2004), kde ze 49 rostlin bylo pozitivních 45, přičemž tato studie uvádí, že pro CVA nebyl nalezen žádný vhodný bylinný hostitel.

Ve stejném roce byl první výskyt potvrzen v Polsku (Komorowska & Cieslinska, 2004) a v následném roce také v Kalifornii na *Prunus avium* cv. Bing, *Prunus serrulata* cv. Kwanzan a na *P. avium* x *P. pseudocerasus* cv. Colt. Všechny tyto druhy jevíly symptomy, které byly ovšem očekávány, protože před provedením pokusu byly rostliny infikovány odlišnými virózními očky; kultivar Bing na listech nesl žilkové nekrózy, pravděpodobně způsobené naočkováním *Prunus necrotic ringspot virus* (PRNSV) a *Prune dwarf virus* (PDV), na listech kultivaru Kwanzan se nacházely nekrotické léze (inokulace PDV) a na listech kultivaru Colt se nacházely chlorotické kroužky (inokulace *Plum bark necrosis and stem pitting associated virus* PBNPaV). Nečekaně se však v těchto rostlinách objeví i CVA (Sabanadzovic et al., 2005).

Časově následný výskyt viru byl potvrzen také v Srbsku, a to konkrétně na *Prunus cerasus* cv. Geroj Ranij, Pandy Iveg Megi, Hajmanov Rubin, Kereska, Maraska iz

Zadra, Gorsemska a Drobia a na *P. avium* cv. Lambert, Noir de Guben, Summit a Strarking Hardy Giant (Mandic et al., 2007).

Zatím nejnověji potvrzený výskyt v Číně je vázán na kultivary třešňové symptomy skvrn a mozaiky, avšak kromě CVA se ve vzorcích vyskytovaly i jiné viry, které mohou být původci těchto projevů a přispění CVA zůstává diskutabilní (Rao et al., 2009).

4 Materiál a metody

Rostlinný materiál

Studium hostitelského okruhu bylo zaměřeno na potenciální přenos ApLV na rostliny tabáku (*Nicotiana* spp.), merlíku (*Chenopodium* spp.), fazolu zahradního (*Phaseolus vulgaris*), tykve olejné (*Cucurbita pepo*), okurky seté (*Cucumis sativus*) mochyňě peruánské (*Physalis peruviana*) a pestrovky kulovité (*Gomphrena globosa*).

Pro studium rozšíření virů ApLV a CVA v České republice byly odebrány vzorky z genofondu ovocných dřevin Ústavu ovocnictví MZLU v Lednici, z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích a od pěstitelů meruněk, třešní a višňů v ČR. Vzorků meruněk pro monitoring ApLV v České republice bylo dohromady otestováno 356 a vzorků třešní a višňů pro detekci CVA 200.

V následujících odstavcích jsou uvedeny a blíže popsány jednotlivé kroky pokusů.

4.1 Pěstování pokusných rostlin

První rostliny byly vysety 27. 3. 2009 a pak následovaly další výsevy v průběhu celé jarní a letní sezóny. Pro lepší vzcházení byly rostliny s drobnějšími semeny vysety do sadbovačů a po úspěšném vzejití byly přepikýrovány. Veškerý rostlinný materiál byl pěstován ve sklenících ČZU.

Další péčí věnovanou rostlinám byla pravidelná záливka a hnojení a v době kolem květu také odstraňování květních vrcholů k umožnění prodloužení vegetace.

Z důvodu výskytu molice a třásněnek se v průběhu pěstování aplikovaly dva ochranné postřiky - v květnu se jednalo o přípravek Calypso, v červnu o přípravek Bioool.

4.2 Inokulace rostlin

K mechanické inokulaci rostlin ve vývojové fázi přibližně tří pravých listů bylo použito šťávy z infekčních rostlin, získané rozmělněním listů v třecí misce s tloučkem a jejich smísením s pufrem. Inokulované rostliny byly před samotným procesem inokulace ponechány 24 hodin v šeru (čehož bylo docíleno zastíněním rostlin papírovými filtračními archy). Jako inokulum byly použity čerstvé listy z ApLV infekčních rostlin

P. persica GF 305 (palestinský izolát Apr-47) (viz Obr. 2 v sekci 9 Přílohy) a z CVA infekčních rostlin *P. avium* (české izoláty 09HOLche a 09TURche).

1 g čerstvých listů byl rozmělněn v 10 ml pufru a takového množství šťávy stačilo na inokulaci 15 rostlin.

Dále metoda inokulace zahrnovala narušení svrchní kutikulární vrstvy karborundovým popraškem, nanesení virové šťávy, potření plochy listu (2-3x prstem ve směru růstu trichomů) a následné odstranění přebytečného materiálu stříčkou s destilovanou vodou.

Pufrů bylo použito několik a konkrétně se jednalo o tyto:

1) Fosfátový pufr draselný I. 0,02 M (pH 7,0)

- 6,15 ml 1 M K_2HPO_4
- 3,85 ml 1 M KH_2PO_4
- 490 ml ddH₂O (dvakrát destilovaná, autoklávovaná)
- 2,5 % nikotin

2) Fosfátový pufr draselný II. 0,02 M (pH 7,0)

- 6,15 ml 1 M K_2HPO_4
- 3,85 ml 1 M KH_2PO_4
- 490 ml ddH₂O
- 50 g PVP

3) Fosfátový pufr sodný 0,02 M (pH 7,0)

- 5,77 ml 1 M Na_2HPO_4
- 4,23 ml 1 M NaH_2PO_4
- 490 ml ddH₂O
- 2,5 % nikotin

4) HEPES I. (pH 7,4)

- 0,71 g HEPES (Hydroxyethylpiperazine ethanesulfonic acid)
- 5 g PVP
- ddH₂O (doplnění do 100 ml)

5) HEPES II. (pH 8,2)

- 1,19 g HEPES
- 2,5 % nikotin
- ddH₂O (doplnění do 100 ml)

Inokulované rostliny byly přemístěny nazpět do skleníku a ponechány v klidu před provedením dalšího kroku po dobu přibližně dvou až tří týdnů, což je dostačující doba pro propagaci viru v rostlině. Odebrané listy nebylo ve většině případů možno zpracovat hned, a proto byly zamrazeny (-20 °C).

4.3 Izolace totální RNA

Protože existuje několik účinných metod izolace nukleových kyselin, bylo třeba stanovit vhodnou metodu, která měla sloužit během izolování všech vzorků. Jako přijatelné byly označeny tři z nich – izolace komerčním kitem (Qiagen), izolace fenol-chloroformem a izolace metodou silica.

Extrakce totální RNA „Silica“ metodou dle Rott & Jelkmann (2001)

Pufry a roztoky používané při procesu izolace byly tyto:

- třecí pufr (4 M guanidin-thiokyanát, 0,2 M octan sodný, 25 mM EDTA, 1 M octan draselný, 2,5 % PVP) + těsně před použitím přidat 2 % metabisulfit
- 10 % N-lauroyl-sarcosine
- ethanol absolutní p.a. ASC, ISO
- 6 M jodid sodný (0,75 g Na₂SO₃ rozpuštěno v 40 ml ddH₂O, ke vzniklému roztoku následně přidáno 36 g NaI)
- silica (vodní suspenze vzniklá smísením 30 g částic silica ve 45 ml H₂O; postup přípravy zahrnuje několikahodinový proces sedimentace, promývání a homogenizace)
- promývací pufr s pH 7,5 (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50 % objemu absolutní ethanol)
- DEPC H₂O (voda ošetřená diethylpyrokarbonátem)

Postup izolace je zachycen v následujících krocích:

- 1) navážení 100 mg vzorku a umístění navážky opatřené alobalem na led
- 2) vychlazení třecí misky a tloučku tekutým dusíkem a následné rozdrcení naváženého vzorku, přidání 1 ml třecího pufru,
- 3) slítí extraktu do 1,5 ml mikrozkuřavky, umístění do ledu
- 4) centrifugace 6000 RPM/ 3 min
- 5) odebrání 500 μ l supernatantu z horní části vytvořené nad suspenzí do nové mikrozkuřavky a přidání 100 μ l N-layroyl-sarcosine, vortex
- 6) temperování vzorků v 70 °C po dobu 10 minut, během procesu 2-3x vortexování
- 7) umístění na 5 minut do ledu
- 8) centrifugace 13000 RPM/ 10 min
- 9) odebrání 300 μ l roztoku do nové mikrozkuřavky, přidání 150 μ l absolutního ethanolu, 300 μ l 6 M jodidu sodného a 25 μ l suspenze silica, vortex
- 10) temperování při pokojové teplotě za mírného třesení (200 RPM) po dobu 10 minut
- 11) centrifugace 6000 RPM/ 1 min
- 12) vylití supernatantu a dodání 500 μ l promývacího pufru
- 13) vortex
- 14) centrifugace 6000 RPM/ 1 min
- 15) opakování kroků 12 – 14 (vylití, promývací pufr, třepání, centrifugace)
- 16) vylití a sušení mikrozkuřavky umístěné na buničině otevřeným víčkem dolů po dobu 10 minut
- 17) přidání 150 μ l DEPC H₂O
- 18) temperování při teplotě 70 °C po dobu 4 minut
- 19) centrifugace 13000 RPM/ 3 min
- 20) odebrání 120 μ l roztoku do nové mikrozkuřavky a umístění vzorku do mrazáku (teplota -20 °C).

Extrakce totální RNA pomocí komerčního kitu

Sada komerčního RNeasy Plant Mini Kitu od firmy Qiagen obsahovala tyto komponenty:

- pufr RLT (před samotným procesem izolace k němu bylo třeba dodat ještě 10 μ l/1 ml merkaptoethanolu)
- pufr RPE
- pufr RW1
- QIA shredder spin column (fialová barva)
- RNeasy spin column (růžová barva)
- RNase-free water (čistá voda)

Následuje popis izolace.

- 1) navážení 100 mg vzorku
- 2) umístění vzorku do vychlazené třecí misky s tloučkem a následné rozdrcení navážky za pomoci tekutého dusíku, následné převedení vzorku do 2 ml mikrozumavky a poté krátké ponechání v otevřené mikrozumavce pro možnost odpaření přebytečného dusíku (cca 1 minuta, poté zavřít víčko)
- 3) přidání 450 μ l RLT pufru, 2 minuty inkubace v 56 °C, vortex
- 4) převedení vzorku do první (QIA shredder spin column) komerční mikrozumavky, centrifugace 13000 g/ 2 min, poté odebrání odstředěné kapaliny do nové mikrozumavky
- 5) přidání polovičního objemového množství absolutního ethanolu, promísení obou kapalin za pomoci pipety
- 6) převedení vzorku do druhé (RNeasy spin column) komerční mikrozumavky, centrifugace 8000 g/ 1 min a následné vylití odstředěné kapalné složky
- 7) přidání 700 μ l RW1 pufru, centrifugace 8000g/ 1 min, opětovné vylití kapalné složky
- 8) přidání 500 μ l RPE pufru, centrifugace 8000g/ 1 min, vylití kapalné složky
- 9) přidání dalších 500 μ l RPE pufru, centrifugace 8000g/ 2 min

- 10) vyjmutí vnitřní části komerční mikrozkuavky a její umístění do nové mikrozkuavky, centrifugace 13000 g/ 1 min
- 11) umístění vnitřní části komerční mikrozkuavky do další nové mikrozkuavky a přidání 50 µl RNase-free water (opatrné nanášení do středu membrány), centrifugace 8000 g/ 1 min
- 12) odstranění komerční vnitřní části a umístění mikrozkuavky do mrazáku (teplota -20 °C).

Fenol-chloroformová extrakce dle Sambrook & Russel (2001)

Zde jsou uvedeny použité pufrы a roztoky:

- extrakční pufr (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 % SDS) pH 7,0
- fenol pH 3,4
- chloroform-izoamylalkohol (v poměru 24:1)
- absolutní ethanol
- 70 % ethanol (připraven ředěním absolutního ethanolu ddH₂O)
- 3 M octan sodný
- ddH₂O

Dále následuje popis postupu izolace.

- 1) navážení 100 mg vzorku, rozdrčení ve vychlazené třecí misce s tloučkem za pomoci tekutého dusíku a převedení vzorku do mikrozkuavky
- 2) přidání 1 ml extrakčního pufru a následné přidání 1 ml fenol-chloroformu v poměru 1:1 (při práci s fenolem používány speciální ochranné brýle)
- 3) 10 minut vortex (1800 RPM), centrifugace 7000 g/ 10 min
- 4) odebrání horní fáze supernatantu (750 µl) do nové mikrozkuavky a dodání stejného množství (750 µl) fenol-chloroformu, 10 minut vortex, centrifugace 7000 g/ 10 min
- 5) odebrání horní fáze (600 µl) do nové mikrozkuavky a dodání stejného množství (600 µl) fenol-chloroformu, 10 minut vortex, centrifugace 7000 g/ 10 min

- 6) odebrání horní fáze (450 μ l) do nové mikrokumavky a přidání shodného množství chloroformu, 10 minut vortex, centrifugace 7000 g/ 10 min
- 7) odebrání 250 μ l z horní fáze supernatantu do nové mikrokumavky a přidání 500 μ l absolutního ethanolu a 25 μ l octanu sodného, následné promísení směsi (v zavřené mikrokumavce) několikanásobným převrácením v ruce
- 8) umístění mikrokumavky (opatřené plastovým zámkem zabraňujícím nechtěnému otevření) do nádoby s tekutým dusíkem, ponechání zde po dobu 30 sec, opakování 3x (vždy poté, co směs opětovně roztála)
- 9) centrifugace 10000 g/ 10 min, vylití supernatantu a přidání 200 μ l 70 % ethanolu, promísení převrácením v ruce (cca 4x)
- 10) centrifugace 10000 g/ 5 min, vylití supernatantu a sušení na buničině (10 minut, při pokojové teplotě, otevřeným víčkem dolů)
- 11) přidání 200 μ l ddH₂O, vortex a umístění mikrokumavky do mrazáku (teplota -20 °C).

4.4 Stanovení integrity RNA

Pro jmenované metody extrakce byla jako jeden z hlavních hodnotících prvků zvolena integrita RNA.

Pro stanovení integrity byla nejprve změřena koncentrace totální RNA a poté byly vzorky sjednoceny na koncentraci 150 ng/ μ l. Vzorky byly smíchány s nanášecí semidenaturační barvou (6x Loading Dye, Fermentas) v poměru 1:1, poté byly inkubovány při 70 °C po dobu 10 minut a následně byly prudce zchlazeny v ledu. Následně byly vzorky po 10 μ l nanášeny do agarózového gelu. Bližší popis přípravy agarózového gelu následuje v kapitole 7.4, a proto jsou v této kapitole více popsány pouze technologické odlišnosti od níže uvedené přípravy – a tedy pufr TAE 10x pH 8,0 (24,2 g Tris, 5,7 ml kyseliny octové, 10 ml 0,5 M EDTA) používán v ředění 1:10 s destilovanou vodou a molekulární marker RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas).

Pokusy se třemi metodami izolace byly prováděny pouze v případě ApLV, neboť předchozími pokusy konzultantky L. Grimové bylo zjištěno, že CVA lze s úspěchem vyizolovat pouze metodou silica.

4.5 Reverzní transkripce (RT)

Samotné reverzní transkripci (sloužící k převedení RNA na cDNA za pomoci enzymu RNA dependentní DNA polymerázy a tedy vedoucí k vytvoření stabilnějšího, méně dgradabilního a do PCR zapojitelného produktu) předcházela odhad koncentrace a čistoty RNA ve vzorku. Hodnoty byly vypočteny z hodnot absorbance naměřené spektrofotometrem (Hélios Gamma Thermo Spectronic, USA) při vlnových délkách 260 a 280 nm. Koncentrace se vypočetla na základě vzorce $C = A_{260} \times 40$ (koeficient) $\times 25$ (neboť vzorek byl vytvořen v poměru RNA : ddH₂O = 1: 24). Čistota pak byla stanovena vydělením hodnoty A_{260} (ideální vlnová délka pro měření nukleové kyseliny) hodnotou A_{280} (ideální délka pro měření kontaminujících složek, proteinů). V případě, že výsledná hodnota se pohybovala v oblasti 1,8, byl vzorek označen za dostatečně čistý.

Konečný proces reverzní transkripce sestával ze dvou kroků. V prvním kroku došlo ke smísení 0,2 μ l reverzního primeru, RNA, jejíž množství bylo zvoleno na základě změřené koncentrace (odpovídající 100 u/ml) a dd vody, jejíž množství dorovnávalo objem vzorku na celkových 11 μ l. Mikrozkušavky se vzniklou směsí byly temperovány 5 minut při 100 °C a poté byly umístěny na led.

Ve druhém kroku bylo do chladnoucích mikrozkušavek připipetováno 1,6 μ l dd H₂O, 4 μ l First Strand pufru (Invitrogen), 1,3 μ l dNTP (Fermentas, 0,4 mM každého nukleotidu), 1 μ l 0,1 M DTT, 0,4 μ l RNAsinu (inhibitoru RNáz, Fermentas) a 0,7 μ l M-MLV reverzní transkriptázy (Fermentas, 200U/ μ l). Mikrozkušavky byly následně ponechány 50 minut ve 42 °C a celý proces byl pro ukončení funkce enzymu zakončen inkubací při 70 °C po dobu 10 minut. Společně se vzorky celým postupem pokaždé procházely i tři mikrozkušavky s obsahem čisté vody, negativního a pozitivního vzorku – z důvodu umožnění zpětné kontroly správnosti provedení reakce.

Reverzní primer používaný pro přepis ApLV byl R-ALV (se sekvencí 5'-3' TCAGCTCACGGAAGTTGGCG) (Grimová et al., 2009a), reverzní primery pro CVA byly dva a to CNESr1 (TTGGTGACGGTGAAGGATTCG) (Grimová, nepublikováno) nebo CVAZR2 (ACCTTTGGAACAAACGATGC) (Grimová et al., 2009b).

4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Do mikrozkušavek byl rozpipetován mastermix složený z 17,05 µl dd vody, 2,5 µl 10x Dream Taq™ pufru (Fermentas), 2 µl MgCl₂ 25 mM, 0,25 µl dNTP (0,4 mM každého nukleotidu), 0,5 µl reverzního a 0,5 µl vedoucího primeru a 0,2 µl Dream Taq™ enzymu (DNA Polymerase, Fermentas). Reverzní primery byly shodné jako v procesu přepisu v předchozí kapitole, jako vedoucí primery pak byly používány pro ApLV F-ALV (GCTGGCTCTAAGGCAGCAGAAC) (Grimová et al., 2009b) a pro CVA CNESf2 (TGTCTTCGCCGCACAAGGTG) (Grimová, nepublikováno) nebo CVAZF2 (CAAGAATCCAGGGGCCTACT) (Grimová et al., 2009a).

Následně byly do víčka přidány 2 µl cDNA vytvořené předchozím procesem reverzní transkripce. Po zavření víček byly vzorky zcentrifugovány (90 RPM/10 sec) a umístěny do termocycleru (MJ Research PTC 200). Program byl sestaven z těchto kroků:

- 1) 95 °C 2 min
- 2) 94 °C 30 sec
- 3) 59 °C 30 sec
- 4) 72 °C 45 sec
- 5) návrat ke kroku 2., opakování 35-krát
- 6) 72 °C 7 min
- 7) 8 °C ukončení reakce

Po vyjmutí mikrozkušavek z termocycleru byly vzorky znovu zcentrifugovány (90 RPM/ 10 sec) a ihned naneseny do gelu či uskladněny v mrazicím boxu (-24 °C).

4.7 Elektroforetická separace nukleových kyselin

K umožnění vizualizace PCR produktů byla použita agarózová elektroforéza. 1,5 % agarózový gel byl připraven rozpuštěním agarózového prášku v 1x TBE pufru (89 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, pH 8,0), díky zahřátí v mikrovlnné troubě. Po uvaření gelu bylo ještě dodáno barvivo ve formě ethidium bromidu v konečné koncentraci 0,5 µl/ml.

Ke vzorkům nanášeným do jamek vychladlého tuhého gelu pak byla kvůli lepší manipulaci přidána nanášecí barva v poměru 5:1,5 (6x Loading Dye Solution, Fermentas) a byly ohraničeny molekulárním markerem (MassRuler DNA Ladder, Low

Range, Fermentas). Gel byl umístěn do horizontální elektroforézy (HE 33 Mini Submarine Unit, Basic, Amersham Biosciensis nebo MultiSUB Midi, Cleaver Scientific Ltd.) a separace probíhala po dobu 1 hodiny při konstantním stejnosměrném napětí 90 V (vložené napětí 4-6 V/cm).

Výsledné fragmenty pak byly vizualizovány na UV transiluminátoru při vlnové délce 300 nm a zachycení snímku výsledného elektroforeogramu proběhlo za pomoci počítačového programu GeneSnap (automatický dokumentační a analytický Bio-Imaging systém InGenius, Syngene).

Velikost amplifikovaných produktů na gelové agarové elektroforéze byla pro ApLV (RALV/FALV) 200 bp a pro CVA (CNESr1/CNESf2 a CVAZR2/CVAF2) 140 bp a 400 bp.

4.8 Studium rozšíření virů v České republice

Tato část práce byla zpracována pracovní skupinou, jejíž součástí jsem se stala v průběhu vypracování mé diplomové práce na katedře ochrany rostlin. Pro zjištění stavu výskytu ApLV byly odebrány vzorky z genofondu meruněk Ústavu ovocnictví v Lednici (356 vzorků), pro zjištění stavu výskytu CVA byly získány vzorky z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích a od pěstitelů třešní a višní (200 vzorků).

Kvůli přesnosti výsledků bylo třeba odebírat vzorky z alespoň dvou stejných rostlin (myšleno stejných kultivarů) a také bylo nutno odebírat listy z různých pater větví, tedy z různých stran a různého stáří. Odůvodněním těchto kroků je fakt, že virus se v dřevinách od iniciální infekce šíří nerovnoměrně z důvodů nepropojenosti vodivých cévních svazků. Proto bylo třeba uvažovat o možnosti výskytu virových částic pouze v určité části stromu.

Odebrané listy byly okamžitě umístěny do chladicích boxů a následně převezeny na pracoviště katedry ochrany rostlin ČZU, kde byly dále postupně zpracovány. Podrobnější protokoly laboratorních analýz jsou výše uvedeny v kapitolách 4.3 až 4.6.

5 Výsledky

Bylinný hostitelský okruh

V průběhu roku 2009 bylo vypěstováno a nainokulováno za pomoci pěti odlišných pufrů celkem 490 bylin z pěti čeledí (*Amaranthaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae*), přičemž se jednalo o druhy *Nicotiana occidentalis*, *N. occidentalis* 'Obligua', *N. benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. sanderae*, *N. longiflora*, *N. tabacum* 'Samsun', *N. tabacum* 'White Burley', *N. silvestris*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo* var. *oleifera*, *Chenopodium botrys*, *Ch. capitatum*, *Ch. amatanticolor*, *Ch. schraderian*, *Ch. faetidum*, *Ch. giganteum*, *Ch. bonus-henricus*, *Physalis peruviana*, *Gomphrena globosa* a *Phaseolus vulgaris* (viz Obr. 1 v sekci 9 Přílohy).

Protože nemalá část pěstovaných rostlin jevila symptomy, za něž by mohly být viry zodpovědné (prosvětlení žilek, chlorotické i nekrotické lokální léze), 210 rostlin bylo následně testováno a všechny testované vzorky byly vyhodnoceny jako negativní. Nedošlo tedy k rozšíření již známého bylinného hostitelského okruhu virů.

Výběr metody izolace

Při srovnávání tří odlišných metod izolace (silica, kit, fenol-chloroform) byl závěr takový, že fenolová izolace (která může mít navíc negativní dopad na zdraví) způsobuje nežádané rozštěpení RNA, zatímco kit a silica zachovávají požadovanou strukturu (viz Obr.7 v sekci 9 Přílohy). Komerční kit pak byl vyloučen pro svou vysokou cenu a pro izolaci RNA bylo tedy použito metody zachycení totální rostlinné RNA v suspenzi silica. Kromě vyhovující integrity byl dalším důvodem také fakt, že CVA nebylo možno vyizolovat jinou metodou, než silica. Současně hodnoty koncentrace totální RNA byly u této metody druhé nejvyšší. Hodnoty absorbance a koncentrace totální RNA jsou pro srovnání zdokumentovány v této ukázkové tabulce:

vzorky	A ₂₆₀	koncentrace (µg/ml)
1. silica	0,19	22,8
2. silica	0,17	20,4
1. kit	0,39	19,5
2. kit	0,19	9,5
1. fenol	0,23	46
2. fenol	0,24	48

Metody RT-PCR probíhaly bez problémů (viz Obr. 8 v sekci 9 Přílohy).

Monitoring ApLV

Ve dnech 21.-22.července 2009 proběhl odběr vzorků (listů meruněk) z genofondu meruňkových kultivarů v Lednici. Z 356 následně analyzovaných vzorků byla infekce virem ApLV na základě RT-PCR prokázána na jednom kultivaru Tomis (výskyt viru na 3 sbírkových stromech odrůdy), původem z Rumunska.

Monitoring CVA

Při testování celkem 200 vzorků třešňových listů získaných z výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích a od pěstitelů meruněk, třešní a višní v ČR, byly 2 rostliny na základě RT-PCR prokázány jako CVA pozitivní. Jednalo se o *P. avium* 'H 15/31' z genetické sbírky ústavu v Holovousích a semenáč *P. avium* ze školky podniku SEMPRA Turnov. Jedná se pravděpodobně o první detekci CVA v České republice.

6 Diskuze

Ačkoliv byla uskutečněna inokulace 450 bylin a 210 vzorků prošlo procesem izolace RNA a RT-PCR (ke zpracování všech nainokulovaných rostlin nedošlo z důvodů časových i finančních), přes toto vysoké množství nebyl v žádné z testovaných rostlin virus nalezen. Tento jev mohl být způsoben hned několika možnostmi. Mohla být chybně zvolena či nesprávně provedena samotná inokulace, avšak použitý postup odpovídal publikovanému postupu (Dijkstra & de Jager, 1998), který by měl mít za následek úspěšné naočkování rostlin, minimálně druhu *Nicotiana occidentalis* virem ApLV, jak uvádí Zemtchik et al. (1998), Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2005) či Gentit et al. (2001a). Inokulace sice neprobíhala v odpoledních hodinách, jak doporučuje Matthews (1992), avšak jinak byly dodržovány body, které autor doporučuje.

Takto široký hostitelský okruh byl volen i přesto, že Zemtchik et al. (1998) či Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2005) uvádějí, že inokulace na některých těchto rostlinách nebyla úspěšná, neboť byl zkoumán vliv odlišného složení pufrů, které mohlo ovlivnit výsledek. Použit byl nejen draselný fosfátový pufr a HEPES pufr se stejným složením, jaké uvádí Zemtchik et al. (1998), ale také dva další fosfátové pufrы - sodný mající shodné pH, přesto však obměněnou strukturu a draselný s jiným inhibitorem taninů. Posledním pufrem byl druhý HEPES zvolený k testování díky odlišnému pH.

Některé inokulované rostliny jevíly symptomy, které odpovídaly úspěšné inokulaci, nicméně po jejich otestování byl výsledek negativní. Tento jev mohl být způsoben nevhodnými pěstebními podmínkami během růstu rostlin. Ve sklenicích se vyskytovali škůdci a i přes aplikaci chemických postřiků byla jejich eliminace obtížná. Také teplota uvnitř skleníků byla během léta vysoká a stresované rostliny mohly reagovat projevem falešných symptomů (viz Obr.6 v sekci 9 Přílohy). Přijatelné by mohly být symptomy, o nichž se u *N. occidentalis* zmiňuje Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2005) a tedy výskyt prosvětlených žilek a lokálních nekrotů na listové čepeli 10-15 dní po inokulaci, bohužel však pěstované tabáky druhu *N. occidentalis* patřily právě do skupiny nesymptomatických rostlin.

Pozitivní výsledky u druhů *N. benthamiana* a *N. tabacum* 'Samsun', které uvádí Ketta (2008), nebyly potvrzeny.

Ačkoliv nebyly v jiných zdrojích nalezeny informace o termální labilitě virů, lze zároveň předpokládat, že výrazně vysoké teploty mohou vést k jejich inhibici. U obou virů a zejména u CVA se prokázala vysoká degradace při manipulaci. Kvůli časové náročnosti byly vzorky skladovány v zamraženém stavu. Zároveň při rozmrazování docházelo k výraznému narušení měkkých rostlinných pletiv. I oba tyto teplotní extrémy mohly mít negativní vliv na integritu virových vláken. V ideálních podmínkách by izolace byla prováděna z čerstvě odebraných listů, ale kvůli vysokým počtům testovaných rostlin byly kroky pracovních operací od sebe vzdáleny i několik měsíců. Je pravděpodobné, že delší setrvání viru v mrtvém rostlinném materiálu povede k jeho degradaci, a to i přes teplotu pod nulou.

Díky používání pozitivních a negativních kontrol lze říci, že kroky po izolaci (RT a PCR) byly provedeny správně a že negativní výsledky byly zapříčiněny něčím jiným, než chybnou aplikací metody.

Také by bylo možné pokusit se o jinou, méně tradiční metodu přenosu viru na hostitele, například použitím kokotice (*Cuscuta* spp.) či třeba za pomoci pylu, háďátek nebo hub, což jsou metody, které u jiných virů popisuje Astier et al. (2007).

Přes vysoký počet rostlin testovaných na přítomnost viru v České republice došlo k potvrzení výskytu pouze na třech vzorcích. U ApLV by v tomto případě mohla hrát roli geografická poloha našeho státu. Výskyt byl zatím potvrzován v jižních zemích, kromě Moldávie se jednalo o Itálii (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2005), Egypt (Maghraby, 2006), Turecko (Gumus et al., 2007), Libanon (Jarrar et al., 2007) a Španělsko (García-Ibarra et al., 2010). Lze tedy odhadovat, že postup viru je zbržděn méně příznivými klimatickými podmínkami.

Co se rozšíření CVA týče, je seznam států různorodější, výskyt je zaznamenán v Německu (Jelkmann, 1995), v Kanadě (James, Jelkmann, 1998), ve Spojeném království (Kirby et al., 2001), v Japonsku (Isogai et al., 2004), v Polsku (Komorowska, Cieslinska, 2004), v Kalifornii (Sabanadzovic et al., 2005), v Srbsku (Mandic et al., 2007) a v Číně (Rao et al., 2009). Nízký výskyt tedy může být vysvětlen dostatečně velkou vzdáleností od infekčních rostlin, případně současným úspěšným dovozem pouze viruprostého materiálu.

7 Závěry a doporučení

490 rostlin požadovaných pro provedení pokusu hledání okruhu bylinných hostitelů bylo úspěšně vypěstovaných a následně nainokulovaných za pomoci pěti odlišných pufrů. Ačkoliv v těchto rostlinách nebyl výskyt viru potvrzen, tento výsledek může být způsoben několika různými faktory a stále existuje možnost, že bylinný okruh ApLV a CVA je širší, než uvádějí jiné zdroje.

Na základě pokusů se třemi metodami izolace virové RNA byla zvolena metoda silica, která zajišťuje zachování integrity vzorku a jejíž výtěžnost a čistota je postačující pro provedení dalších kroků a zároveň je finančně dostupná i pro izolaci většího množství vzorků.

Izolace RNA byla provedena u 210 vzorků inokulovaných rostlin, správné provedení této metody bylo zkontrolováno změřením koncentrace RNA ve vzorcích za pomoci spektrofotometru. K detekci virů ve vzorcích získaných izolací infikovaných bylin byla použita metoda RT-PCR, jejíž vhodnost se potvrdila díky využití pozitivních vzorků jako pozitivních kontrol během jednotlivých pokusů.

Při provádění monitoringu výskytu virů v České republice byl výskyt ApLV potvrzen u jednoho kultivaru a výskyt CVA u dvou kultivarů. Tato detekce je vůbec prvním potvrzeným výskytem obou virů v České republice. Na základě tohoto pokusu bych doporučila věnovat se i nadále studiu vlastností zkoumaných virů a jejich rozšíření v České republice, neboť i nadále zůstává většina informací neodhalených.

Pro vypěstování bylin bych doporučovala důslednější dodržování podmínek vhodných pro optimální růst zdravých a nestresovaných rostlin ve skleníku. Navrhovala bych vyzkoušet i jiný, než mechanický přenos virů na bylinné hostitele, případně pokusit se o přenos na doposud netestované hostitele dřevinné.

Pro metodu izolace (jak z rostlin při zkoumání hostitelského okruhu, tak při monitoringu výskytu virů) doporučuji využívat čerstvých listů, tudíž doporučuji pracovní operace naplánovat tak, aby bylo používáno rostlinného materiálu v množství, které lze zpracovat během jednoho dne a není třeba obdržené vzorky zamrazovat.

Pro monitoring by bylo vhodné odebrat vzorky i ze sadů, které doposud nebyly testované.

8 Seznam literatury

1. Abou Ghanem-Sabanazdovic N., Abbadi H., Rwahnih M.A., Castellano M.A., Myrta A. (2005): Identification and partial characterization of an isolate of apricot latent virus from Palestine. *Journal of Plant Pathology* 87: 37-41.
2. Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Fauquet C.M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-1060.
3. Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., Lecoq H. (2007): Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus Ecology. Science publishers. 472 pp. ISBN 978-1-57808-316-9.
4. Blažek J., Beneš V., Dlouhá J., Janečková M., Kneifl V., Kosina J., Lánský M., Paprštejn F., Pražák M., Pelíšek B., Svoboda A., Steněk J., Sus J. (1998): *Ovocnářství*, 1. vyd. Český zahrádkářský svaz, nakladatelství Květ. 383 pp. ISBN 80-85362-33-3.
5. Dickinson M. (2003): Molecular plant pathology. BIOS Scientific Publishers. 244 pp. ISBN 1-85996-044-8.
6. Diekmann M., Putter C.A.J. (1996): Stone fruits. FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm ; no. 16. 109 pp. ISBN 9290431601.
7. Dijkstra J., de Jager C.P. (1998): Practical plant virology: Protocols and Exercises. Springer-Verlag. 459 pp. ISBN 3-540-63759-1.
8. García-Ibarra A., Martínez-Gómez P., Rubio M., Dicenta F. (2010): First report of Apricot latent virus and Plum bark necrosis stem pitting-associated virus in Apricot from Spain. *Plant Disease* 94: 275.
9. Gentit P., Foissac X., Svanella-Dumas L., Candresse T. (2001a): Variants of apricot latent foveavirus (ALV) isolated from south European orchards associated with peach asteroid spot and peach sooty ringspot diseases. *Acta-Horticulturae* 550: 213-219.

10. Gentit P., Foissac X., Svanella-Dumas L., Peypelut M., Candresse T. (2001b): Characterization of two different apricot latent virus variants associated with peach asteroid spot and peach sooty ringspot diseases. *Archives of Virology* 146: 1453-1464.
11. Gumus M., Paylan I.C., Matic S., Myrta A., Sipahioglu H.M., Erkan S. (2007): Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in western Anatolia, Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89: 265-268.
12. Grimová L., Zouhar M., Ryšánek P., Drabešová J., Mazáková J., Paprštejn F. (2009a): First occurrence of *Cherry virus A* in the Czech Republic. In: „21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops“, Neustadt, Germany. p 60.
13. Grimová L., Zouhar M., Ryšánek P., Bazzoni A., Palmisano F., Minafra A., Savino V. (2009b): Biological characterization of *Apricot latent virus* and its survey in the Czech Republic. In: „XV Congresso Nazionale di Patologia Vegetale Locorotondo“, Locorotondo, Italy. p 143.
14. Grimová L., Bazzoni A., Ryšánek P., Palmisano F., Zouhar M., Minafra A., Savino V. (2010): Biological characterization and variability in the coat protein gene of an isolate of *Apricot latent virus*. *Journal of Plant Pathology* 92: 111-116.
15. Hull R. (2009): *Comparative plant virology*. Elsevier Academic Press. 376 pp. ISBN 978-0123741547.
16. Isogai M., Ayogai J., Nakagawa M., Kubodera Y., Satoh K., Katoh T., Inamori M., Yamashita K., Yoshikawa N. (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70: 288-291.
17. James D., Jelkmann W. (1998): Detection of *Cherry virus A* in Canada and Germany. *Acta Horticulturae* 472: 299-304.
18. Jarrar S. (2005): Biological, serological and molecular characterization of *Apricot latent virus* (ApLV). PhD thesis.

19. Jarrar S., Choueiri E., Sánchez-Navarro J.A., Myrta A., Zammar S.E., Savino V., Pallas V. (2007): First report of apricot latent virus in Lebanon. *Journal of Plant Pathology* 89: 301-305.
20. Jelkmann W. (1995): Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology* 76: 2015-2024.
21. Kazda J., Jindra Z., Kabíček J., Prokinová E., Ryšánek P., Stejskal V. (2003): *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*. 3. vyd., Farmář. 158 pp. ISBN 80-86726-03-7.
22. Ketta H. (2008): Characterization of Apricot latent virus. MSc. thesis
23. Khan J.A., Dijkstra J. (2006): *Handbook of plant virology*. Haworth Press, Inc. 452 pp. ISBN 1-56022-979-9.
24. Kirby M.J., Adams A.N. (2001): Occurrence of Cherry virus A in the UK. *Plant pathology* 50: 801.
25. Komorowska B., Cieslinska M. (2004): First report of Cherry virus A and Little cherry virus-1 in Poland. *Plant Disease* 88: 909.
26. Kremer B.P. (1984): *Stromy*. Nakladatelství Ikar Praha. 287 pp. ISBN 80-7176-184-2.
27. Maghraby I.E., Sánchez-Navarro J., Matic S., Myrta A., Pallás V. (2006): First report of two viruses with filamentous particles from stone fruit trees in Egypt. *Journal of Plant Pathology* 88: 65–70.
28. Mandic B., Myrta A., Rwahnih M.A., Jarrar S., Castellano M.A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology* 89: 103-108.
29. Martelli G.P., Jelkmann W. (1998): *Foveavirus*, a new plant virus genus. *Archives of Virology* 143/6.
30. Matthews R.E.F. (1992): *Fundamentals of plant virology*. Academic press, Inc. 403 pp. ISBN 0-12-480558-2.

31. Mezera A., Hísek K. (1989): Naše stromy a keře. Albatros, Praha. 426 pp. ISBN 13-907-89.
32. Nemchinov L., Hadidi A. (1998): Apricot latent virus: a novel stone fruit pathogen and its relationship to apple stem pitting virus. *Acta-Horticulturae* 472: 159-173.
33. Nemchinov L.G., Shamloul A.M., Zemtchik E.Z., Verderevskaya T.D., Hadidi A. (2000): Apricot latent virus: a new species in the genus Foveavirus. *Archives of Virology* 145: 1801-1813.
34. Rao G.P., Myrta A., Kai Shu Ling (2008): Plant pathogens series: characterization, diagnosis & management of plant viruses, Vol. 2, Horticultural Crops, Studium Press LLC: 302.
35. Rao W.L., Zhang Z.K., Li R. (2009): First report of cherry virus A in sweet cherry trees in China. *Plant Disease* 93: 425.
36. Rott M. E., Jelkmann W. (2001): Characterization and detection of several viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107: 411-420.
37. Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Rowhani A., Grant J.A., Uyemoto J.K. (2005): Detection of *Cherry virus A*, Cherry necrotic rusty mottle virus and *Little cherry virus 1* in California orchards. *Journal of Plant Pathology* 87 (3): 173-177.
38. Sambrook J., Russel D.W. (2001): Molecular cloning. Laboratory manual. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. Uyemoto J.K., Scott S.W. (1992): Important diseases of *Prunus* caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. *Plant disease* 76: 5-11.
40. Vidhyasekaran P. (2007): Handbook of Molecular Technologies in Crop Disease Management. The Haworth Press, Inc. 462 pp. ISBN 1-56022-266-2.
41. Zacha V. (1988): Choroby a škůdci peckovin. Český zahrádkářský svaz. Vydavatelství Naše vojsko, n. p. Praha. 31 pp.

42. Zemtchik E.Z., Verderevskaya T.D., Kalashian Yu.A. (1998): Apricot latent virus: transmission, purification and serology. Acta-Horticulturae 472: 153-158

Ostatní zdroje

ANONYM 1 [online]: taxonomická společnost ICTV,
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

ANONYM 2 [online]: situační a výhledová zpráva MZE,
http://eagri.cz/public/eagri/file/2810/OVOCE_10_2009.pdf

9 Přílohy

Fotodokumentace a tabulky



Obr. 1: První fáze pokusu - pěstování rostlinného materiálu. Foto E. Žárová.



Obr. 2: Symptomy ApLV pozorované na broskvoni GF 305. Foto L. Grimová.



Obr. 3: *P. persica* GF 305, zdroj ApLV pozitivních vzorků. Rostlina umístěná před skleníky FAPPZ. Foto L. Grimová.



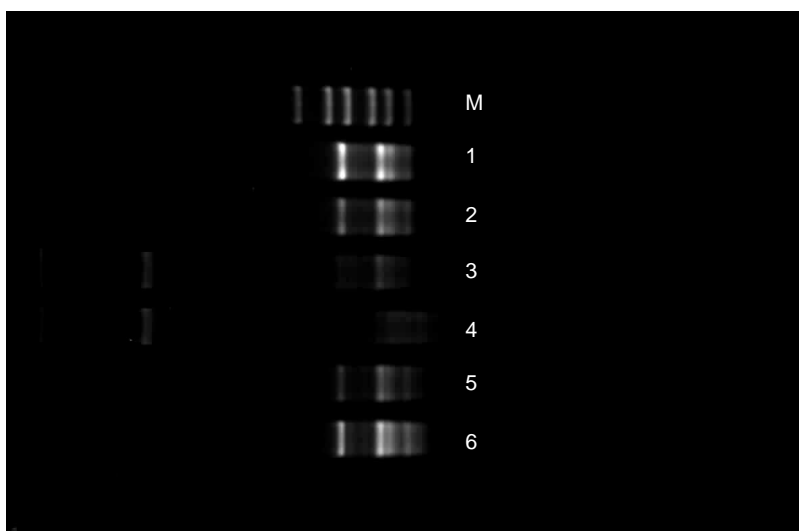
Obr. 4: Nesymptomatické listy CVA pozitivní rostliny *P. avium*. Foto L. Grimová.



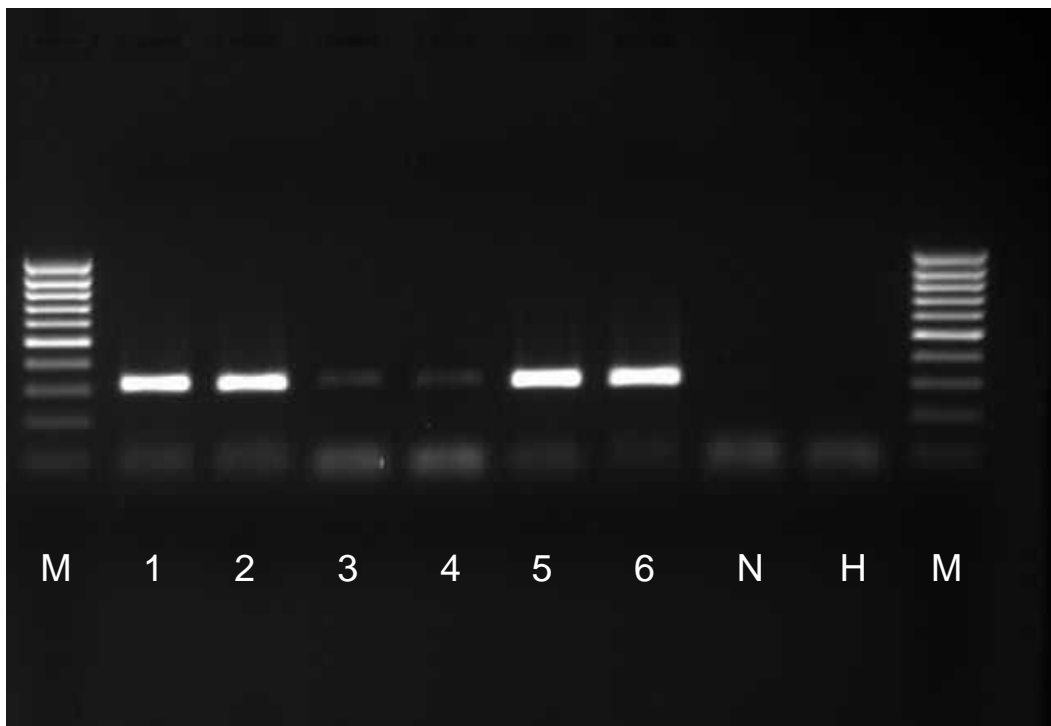
Obr. 5: CVA pozitivní *P. avium* umístěná ve skleníku FAPPZ. Foto L. Grimová.



Obr. 6: Prosvětlená žilnatina (*Nicotiana benthamiana*) – falešný symptom. Foto Eliška Žárová.



Obr. 7: Integrita RNA - agarózový gel izolátů při testování metod izolace. ApLV vzorky odebrané z *P. persica* GF 305. (M: molekulární marker MassRuler (Low Range, Fermentas), 1. a 2.: kit, 3. a 4.: fenol-chloroform, 5. a 6.: silica). Foto GeneSnap program.



Obr. 8: Agarózový gel PCR produktů při testování metod izolace. ApLV vzorky odebrané z *P. persica* GF 305. Velikost amplifikovaného PCR produktu 200 bp. (M: molekulární marker MassRuler (Low Range, Fermentas), 1 a 2: kit, 3 a 4: fenol-chloroform, 5 a 6: silica, N: negativní kontrola GF 305, H: negativní kontrola H₂O). Foto GeneSnap program.

rostlina	pufr	rostlina	pufr	rostlina	pufr	rostlina	pufr
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + PVP
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-N	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + PVP	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + PVP
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-N	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. sativus</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. sativus</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>C. sativus</i>	HE-N	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + PVP
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. botrys</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + PVP	<i>Ch. botrys</i>	HE-N	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	HE-N	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-N	<i>Ch. botrys</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	F-K + PVP	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	HE-N	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	HE-S	<i>G. globosa</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N	<i>G. globosa</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-Na + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-K + NIC	<i>G. globosa</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-Na + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + PVP	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC	<i>G. globosa</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + PVP	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-N	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	F-Na + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-Na + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + PVP	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-Na + NIC
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. benthamiana</i>	F-Na + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	F-K + PVP	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-N	<i>P. peruviana</i>	F-K + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	HE-N	<i>P. peruviana</i>	F-Na + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-N	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	HE-S
						<i>P. peruviana</i>	HE-N

Tab. 1: Rostliny inokulované ApLV

rostlina	pufr	rostlina	pufr	rostlina	pufr
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. botrys</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-S
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-Na + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	F-Na + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-N	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. 'Obliqua'</i>	HE-N	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	F-K + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	F-K + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	F-Na + NIC
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	F-Na + NIC
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	HE-S
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	HE-S
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-Na + NIC	<i>P. peruviana</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	HE-N	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>G. globosa</i>	F-Na + NIC
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>G. globosa</i>	F-Na + NIC
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>G. globosa</i>	HE-S
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>G. globosa</i>	HE-S
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	F-K + NIC	<i>G. globosa</i>	HE-N
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>C. sativus</i>	F-Na + NIC	<i>G. globosa</i>	HE-N
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>C. sativus</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	HE-N	<i>P. vulgaris</i>	F-Na + NIC
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>Ch. botrys</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
		<i>Ch. botrys</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N

Tab. 2: Rostliny inokulované CVA

rostlina	pufr	rostlina	pufr	rostlina	pufr
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-K + PVP	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. bonus-henricus</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. benthamiana</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	F-K + NIC	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-S
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	HE-N
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-S	<i>P. vulgaris</i>	HE-N

Tab. 3: Vyhodnocené rostliny (ApLV)

rostlina	pufr	rostlina	pufr	rostlina	pufr
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. longiflora</i>	HE-S	<i>Ch. schraderian</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. schraderian</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-K + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. glutinosa</i>	F-K + NIC	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-S
<i>N. occidentalis</i>	F-Na + NIC	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. amaranticolor</i>	HE-N
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. glutinosa</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-S	<i>N. 'Samsun'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	F-K + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-Na + NIC
<i>N. occidentalis</i>	HE-N	<i>N. 'Samsun'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. 'W.B.'</i>	F-K + NIC	<i>Ch. giganteum</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>N. 'W.B.'</i>	HE-S	<i>Ch. giganteum</i>	HE-N
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	F-K + NIC	<i>N. silvestris</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	F-K + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-S	<i>C. pepo</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	F-Na + NIC
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-N	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	HE-S
<i>N. 'Obligua'</i>	HE-N	<i>C. pepo</i>	HE-S	<i>P. peruviana</i>	HE-S
<i>N. benthamiana</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	F-K + NIC	<i>P. peruviana</i>	HE-N
<i>N. rustica</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	F-Na + NIC	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>C. sativus</i>	HE-S	<i>G. globosa</i>	F-K + NIC
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. capitatum</i>	HE-N	<i>G. globosa</i>	F-Na + NIC
<i>N. sanderae</i>	F-K + NIC	<i>Ch. faetidum</i>	F-K + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-K + NIC
<i>N. sanderae</i>	HE-S	<i>Ch. faetidum</i>	F-Na + NIC	<i>P. vulgaris</i>	F-Na + NIC

Tab. 4: Vyhodnocené rostliny (CVA)

Vysvětlivky k pufrům:

F-K + NIC = fosfátový draselný s nikotinem

F-K + PVP = fosfátový draselný s PVP

F-Na + NIC = fosfátový sodný s nikotinem

HE-S = HEPES s pH 7,4

HE-N = HEPES s pH 8,2