

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2021**

**Bc. Kateřina Neumanová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká  
fakulta**

**Katedra buněčné biologie  
a genetiky**



***Genetická variabilita *Pea necrotic  
yellow dwarf virus*, zástupce rodu  
*Nanovirus****

**Diplomová práce**

**Bc. Kateřina Neumanová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina NEUMANOVÁ**  
Osobní číslo: **R190066**  
Studijní program: **N1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Genetická variabilita Pea necrotic yellow dwarf virus, zástupce rodu Nanovirus.**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Shrnutí aktuálních poznatků o genomu a genetické struktuře nanovirů s důrazem na Pea necrotic yellow dwarf virus.
2. Izolace DNA z rostlinného materiálu, detekce a PCR amplifikace genomických fragmentů PNYDV, jejich sekvenování.
3. Bioinformatická analýza sekvenčních dat; genetická, rekombinantní analýza detekovaných izolátů a jejich genomických částí.
4. Fylogenetická analýza českých izolátů v kontextu evoluce PNYDV a evoluce nanovirů.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- Gaafar et al. (2016) *Vicia faba*, *V. sativa* and *Lensculinaris* as new hosts for Pea necrotic yellow dwarf virus in Germany and Austria. *New Disease Reports* 34, 28.
- Gaafar et al. (2017) First report of Pea necrotic yellow dwarf virus in The Netherlands. *New Disease Reports* 35, 23.
- Grigoras et al. (2014) Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Journal of General Virology* 95(5): 1178-1191.
- Grigoras et al. (2010) High Variability and Rapid Evolution of a Nanovirus. *Journal of Virology* 84 (18) 9105-9117
- Gronenborn B. (2004) Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet Microbiol.* 98(2):103-109.
- Sicard A. et al. (2015) Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View. *Journal of Virology* 89(19): 9719-26

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: **12. října 2019**  
Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2021**

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. listopadu 2019

## Bibliografické údaje

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina Neumanová

Název práce: Genetická variabilita *Pea necrotic yellow dwarf virus*, zástupce rodu *Nanovirus*

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: *Pea necrotic yellow dwarf virus*, PNYDV, *Nanoviridae*, *Nanovirus*, genetická variabilita, fylogenetická analýza, rekombinace

Počet stran: 78

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

## Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá molekulárně genetickou charakteristikou českých izolátů *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), zástupce rodu *Nanovirus*, čeledi *Nanoviridae*.

Teoretická část shrnuje obecné znalosti jak o čeledi *Nanoviridae*, jejich morfologii, biologických vlastnostech a organizaci genomu, ale také se detailněji zaměřuje na popis viru *pea necrotic yellow dwarf virus* samotného. Závěrem shrnuje obecné poznatky o rekombinacích a přeskupování genomu u ssDNA virů.

Praktická část se soustředí na popis genomu získaných virových izolátů. Nejdříve se zabývá detekcí a amplifikací jednotlivých genomových segmentů u 26 českých izolátů PNYDV. Sangerovým sekvenováním byly získány parciální sekvence DNA-C, -M, -N, -R, -S, -U2 a -U4 o délce 861–939 bp, nepodařilo se amplifikovat segment DNA-U1. Byly identifikovány a charakterizovány základní motivy v genomových segmentech PNYDV (kmenová smyčka, replikační počátek, TATA box a polyadenylační signál) a byly identifikovány významné změny v jejich struktuře. Mutace se ve většině případů vyskytovaly pouze v nekódujících oblastech, v oblasti kódující byly mutace pouze výjimkou či se jednalo o synonymní mutace. Genetickou a fylogenetickou analýzou pomocí neighbor-joining metody bylo zjištěno, že jednotlivé genomové segmenty tvoří silně homogenní skupiny a jejich variabilita je celkově velmi nízká. České izoláty PNYDV se od evropských izolátů téměř nelišily. V rámci všech známých izolátů PNYDV bylo identifikováno 7 rekombinantních událostí, z toho pět rekombinantních segmentů (mezi DNA-C a -N; DNA-N a -C; DNA-U4 a -N) bylo detekováno u českých PNYDV izolátů. Je také diskutována epidemiologie viru a možnost jeho dalšího šíření v ČR a Evropě.

## Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Kateřina Neumanová

Title: Genetic variability of *Pea necrotic yellow dwarf virus*, g. *Nanovirus*.

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: *Pea necrotic yellow dwarf virus*, PNYDV, *Nanoviridae*, *Nanovirus*, genetic variability, phylogenetic analysis, recombination

Number of pages: 78

Number of appendices: 0

Language: czech

## Summary

This diploma thesis deals with molecular and genetic characterisation of Czech isolates of *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), a representative of the genus *Nanovirus*, family *Nanoviridae*.

The theoretical part summarizes general knowledge about family *Nanoviridae*, its morphology, biological characteristics and genome organization, but it also focuses on the description of the pea necrotic yellow dwarf virus itself in detail. Finally, it summarizes the general knowledge about recombination and genetic reassortments of ssDNA viruses.

The experimental part focuses on the description of the genome of obtained viral isolates. Firstly, it deals with the detection and amplification of genomic segments in 26 Czech PNYDV isolates. Partial sequences of DNA-C, -M, -N, -R, -S, -U2 and -U4 of 861–939 bp in length were obtained by Sanger sequencing. It failed to amplify DNA-U1 segment. The basic motifs in the PNYDV genomic segments (stem loop, origin of replication, TATA box and polyadenylation signal) were identified and characterized, and significant changes in their structure were detected. In most cases, the mutations occurred only in the non-coding regions, in the coding region the mutations were only an exception or were synonymous mutations. Genetic and phylogenetic analysis using the neighbour-joining method revealed that the individual genomic segments form strongly homogeneous groups and the variability is very low. Czech PNYDV isolates were almost identical from European isolates. Within all known PNYDV isolates, 7 recombinant events were identified, of which five recombinant segments (between DNA-C and -N; DNA-N and -C; DNA-U4 and -N) were detected in Czech PNYDV isolates. The epidemiology of the virus and the possibility of its further spread in the Czech Republic and Europe are also discussed.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci .....

.....

Bc. Kateřina Neumanová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, nápady a hlavně trpělivost, čas a ochotu, kterou mi v průběhu celé práce věnovala. Také bych ráda poděkovala všem členům Laboratoře molekulární biologie organismů, kteří mi vždy ochotně pomáhali a trpělivě zodpovídali všechny mé dotazy.

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Literární přehled .....	3
3.1	Čeďed' <i>Nanoviridae</i> .....	3
3.1.1	Morfologie a struktura virionů zástupců čeďedi <i>Nanoviridae</i> .....	4
3.1.2	Biologické vlastnosti zástupců čeďedi <i>Nanoviridae</i> .....	5
3.1.3	Organizace genomů zástupců čeďedi <i>Nanoviridae</i> a jejich replikace .....	6
3.2	Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) .....	10
3.2.1	Biologické vlastnosti viru .....	10
3.2.2	Geografická distribuce viru .....	12
3.2.3	Virové proteiny PNYDV a jejich funkce .....	13
3.3	Rekombinace u ssDNA virů .....	16
3.3.1	Rekombinace u čeďedi <i>Nanoviridae</i> .....	18
3.3.2	Přeskupování genomu u čeďedi <i>Nanoviridae</i> .....	18
4	Materiál a metody .....	20
4.1	Biologický materiál .....	20
4.2	Použitě chemikálie, soupravy a roztoky .....	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	21
4.4	Použitě experimentální a vyhodnocovací postupy .....	22
4.4.1	Izolace DNA .....	22
4.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	23
4.4.3	Elektroforetická separace .....	25
4.4.4	Izolace PCR produktu .....	25
4.4.5	Sangerovo sekvenování .....	26
4.4.6	Bioinformatická analýza .....	27



5	Výsledky.....	28
5.1	Detekce a amplifikace genomových segmentů PNYDV .....	28
5.2	Charakteristika českých PNYDV izolátů .....	30
5.2.1	Základní motivy detekované v genomových segmentech izolátů viru.....	30
5.2.2	Genetická analýza DNA-C .....	32
5.2.3	Genetická analýza DNA-M .....	34
5.2.4	Genetická analýza DNA-N.....	36
5.2.5	Genetická analýza DNA-R.....	38
5.2.6	Genetická analýza DNA-S .....	38
5.2.7	Genetická analýza DNA-U2.....	41
5.2.8	Genetická analýza DNA-U4.....	43
5.2.9	Rekombinantní analýza .....	45
6	Diskuze .....	47
7	Závěr.....	51
8	Literatura .....	53

## Seznam symbolů a zkratek

<b>ABTV</b>	<i>Abaca bunchy top virus</i>
<b>Acc. No.</b>	přístupové číslo („Accession number“)
<b>AK</b>	aminokyseliny
<b>AtG3BP</b>	analog lidského G3BP u <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>AUT</b>	Rakousko
<b>BBTV</b>	<i>Banana bunchy top virus</i>
<b>BMLRV</b>	<i>Black medic leaf roll virus</i>
<b>CdBDV</b>	<i>Cardamom bushy dwarf virus</i>
<b>CFDV</b>	<i>Coconut foliar decay virus</i>
<b>Clink</b>	Clink protein
<b>CP</b>	plášťový protein
<b>CZE</b>	Česká republika
<b>DEU</b>	Německo
<b>DNK</b>	Dánsko
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>dsDNA</b>	dvouvláknová DNA
<b>ELISA</b>	„enzyme-linked immunosorbent assay“
<b>FBNSV</b>	<i>Faba bean necrotic stunt virus</i>
<b>FBNYV</b>	<i>Faba bean necrotic yellows virus</i>
<b>FBYLV</b>	<i>Faba bean yellow leaf virus</i>
<b>G3BP</b>	„Ras-GAP SH3 domain binding“ protein
<b>ICTV</b>	„International Committee on Taxonomy of Viruses“
<b>IR</b>	invertované repetice
<b>kat. č.</b>	katalogové číslo
<b>KBB</b>	Katedra buněčné biologie a genetiky
<b>LMBM</b>	Laboratoř molekulární biologie mikroorganismů
<b>MDV</b>	<i>Milk vetch dwarf virus</i>
<b>MP</b>	„movement“ protein
<b>M-Rep</b>	iniciační replikační protein
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA
<b>NCBI</b>	„National Center for Biotechnology Information Search database“

<b>NLD</b>	Nizozemsko
<b>NLS</b>	jaderná lokalizační sekvence
<b>NSP</b>	„nuclear shuttle“ protein
<b>NT</b>	nukleotidy
<b>nt-sekvence</b>	nukleotidová sekvence
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PEMV</b>	<i>Pea enation mosaic virus</i>
<b>PepGMV</b>	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
<b>PHYVV</b>	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>
<b>PNYDV</b>	<i>Pea necrotic yellow dwarf virus</i>
<b>PřF</b>	Přírodovědecká fakulta
<b>PYSV</b>	<i>Pea yellow stunt virus</i>
<b>RBR</b>	retinoblastomový protein
<b>REn</b>	„replication enhancer“ protein
<b>Rep</b>	iniciační replikační protein
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>SCSV</b>	<i>Subterranean clover stunt virus</i>
<b>SG</b>	stresová granula
<b>SKP1</b>	„S-phase kinase-associated protein 1“
<b>SPCSV</b>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
<b>SPFMV</b>	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>
<b>ssDNA</b>	jednovláknová DNA
<b>ToCV</b>	<i>Tomato chlorosis virus</i>
<b>TSWV</b>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
<b>ÚKZUZ</b>	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
<b>v-ori</b>	virový počátek replikace

## Seznam obrázků

**Obrázek 1:** Virové částice *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV).

**Obrázek 2:** Schéma stavby virionů zástupců čeledi *Nanoviridae*.

**Obrázek 3:** Symptomatické rostliny napadené zástupci čeledi *Nanoviridae*.

**Obrázek 4:** Schéma organizace genomu zástupců rodu *Nanovirus*.

**Obrázek 5:** Schéma organizace genomu zástupců rodu *Babuvirus*.

**Obrázek 6:** Schéma mechanismu replikace valivou kružnicí.

**Obrázek 7:** PNYDV infikované rostliny hrachu setého (vlevo a vpravo) a kontrolní rostlina (uprostřed).

**Obrázek 8:** Fotografie pole bobu obecného (*Vicia faba* L.) napadeného PNYDV.

**Obrázek 9:** Mapa výskytu pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV).

**Obrázek 10:** Souhrnné schéma interakcí proteinů PNYDV.

**Obrázek 11:** Detekce genomových segmentů DNA-C (A) a DNA-N (B) PNYDV.

**Obrázek 12:** Detekce PNYDV genomových segmentů DNA-M (A), DNA-R (B), DNA-S (C), DNA-U2 (D) a DNA-U4 (E) PNYDV.

**Obrázek 13:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-C segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí Clink proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 14:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-M segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí ‚movement‘ proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 15:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-N segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí NSP proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 16:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-R segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí M-Rep proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 17:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-S segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí plášťového proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 18:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-U2 segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí U2 proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

**Obrázek 19:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-U4 segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí U4 proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nukleotidových sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

## Seznam tabulek

**Tabulka 1:** Seznam testovaných vzorků.

**Tabulka 2:** Seznam použitých primerů.

**Tabulka 3:** Složení reakční směsi pro PCR reakci pro 1 test.

**Tabulka 4:** Podmínky PCR amplifikace.

**Tabulka 5:** Teploty nasedání primerů.

**Tabulka 6:** Složení reakční směsi pro sekvenační značení pro 1 test.

**Tabulka 7:** Podmínky sekvenačního značení.

**Tabulka 8:** Sekvence a pozice charakteristických motivů PNYDV (pozice vztažená k předpokládané plné délce jednotlivých ssDNA).

**Tabulka 9:** Výsledky rekombinantní analýzy.

# 1 Úvod

Jednovláknové DNA (ssDNA) viry infikují většinu žijících organismů. Napadají zástupce prokaryot (*Microviridae* a *Inoviridae*), rostlin (*Geminiviridae* a *Nanoviridae*), živočichů (*Anelloviridae*, *Circoviridae* a *Parvoviridae*), ale například i člověka samotného. U živočichů či člověka ssDNA viry nezpůsobují žádná fatální onemocnění, naopak jsou ale velkou hrozbou pro rostlinný svět. Choroby vyvolávané rostlinnými ssDNA viry závažně poškozují kulturní plodiny, což vede k poklesu výnosu a kvality jejich produkce.

Příkladem významné skupiny plodin, kterou napadá širší skupina ssDNA virů, jsou luštěniny, a jedním ze závažných patogenů právě bobovitých rostlin je nově popsáný zástupce čeledi *Nanoviridae*, rodu *Nanovirus*, *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV). Tento virus napadá hrách setý (*Pisum sativum* L.), čočku jedlou (*Lens culinaris* Medik.), bob obecný (*Vicia faba* L.) nebo vikvi setou (*Vicia sativa* L.), u nichž způsobuje stáčení, žloutnutí listů a zakrslost, což může vést až k úhynu hostitelské rostliny. PNYDV je v posledních letech intenzivně zkoumán, jelikož dochází k jeho rozšiřování v rámci Evropy. Od svého objevu v roce 2009 byl detekován v Německu, Rakousku, Nizozemsku a Dánsku.

Tato diplomová práce se zabývá identifikací a charakterizací izolátů PNYDV nově detekovaných v České republice a rozšiřuje znalosti o jeho genetické variabilitě a evoluční příbuznosti s izoláty získanými v jiných evropských zemích.

## **2 Cíle práce**

1. Shrnutí aktuálních poznatků o genomu a genetické struktuře nanovirů s důrazem na pea necrotic yellow dwarf virus.
2. Izolace DNA z rostlinného materiálu, detekce a PCR amplifikace genomických fragmentů PNYDV, jejich sekvenování.
3. Bioinformatická analýza sekvenčních dat; genetická, rekombinantní analýza detekovaných izolátů a jejich genomických částí.
4. Fylogenetická analýza českých izolátů v kontextu evoluce PNYDV a evoluce nanovirů.



## 3 Literární přehled

### 3.1 Čeleď *Nanoviridae*

Jednovláknové DNA (ssDNA) viry napadají rostliny, živočichy, ale i člověka samotného. Mezi rostlinné ssDNA viry se řadí dvě čeledě, *Geminiviridae* a *Nanoviridae*. Dříve než byla vytvořena samotná čeleď *Nanoviridae*, byl v roce 1998 ustanoven rod *Nanovirus*. Čeleď *Nanoviridae* byla vytvořena až v roce 2002. Ve stejném roce byl také do této čeledi přidán druhý rod názvem *Babuvirus* (Lal *et al.*, 2020b; Mayo, 2002; Pringle, 1998). Název čeledi *Nanoviridae* je odvozen z řeckého *nanos* (trpaslík), což odkazuje na velikost virionů a genomových segmentů, ale také na schopnost jejich zástupců způsobovat zakrslost u rostlin (ICTV, 2021).

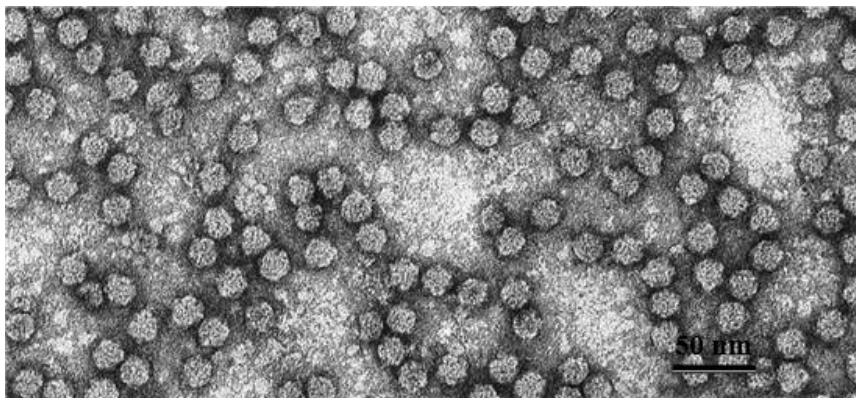
Aktuálně je do čeledi zařazeno 12 druhů. Jedná se o 3 zástupce rodu *Babuvirus*: *Abaca bunchy top virus* (ABTV), *Banana bunchy top virus* (BBTV) a *Cardamom bushy dwarf virus* (CdBBDV), 8 zástupců rodu *Nanovirus*: *Black medic leaf roll virus* (BMLRV), *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV), *Faba bean yellow leaf virus* (FBYLV), *Milk vetch dwarf virus* (MDV), *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), *Pea yellow stunt virus* (PYSV) a *Subterranean clover stunt virus* (SCSV). Poslední zástupce *Coconut foliar decay virus* (CFDV) nebyl dosud zařazen do konkrétního rodu (ICTV, 2021).

Klasifikace zástupců *Nanoviridae* vychází z molekulárních a biologických kritérií. U některých zástupců ale bylo zjištěno, že se jejich okruhy hostitelů prolínají, proto je aktuálně doporučeno upřednostňovat nad biologickými kritérii kritéria molekulární, která se jeví jako vhodnější pro přesnou identifikaci a zařazení do druhů a rodů. Základní taxonomická kritéria doporučená pro čeleď *Nanoviridae* dle ICTVdb (2021) jsou:

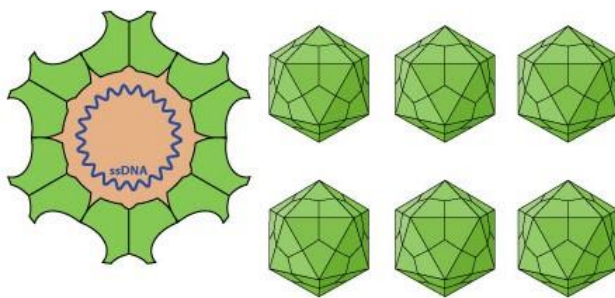
- Rozdíly v přirozeném okruhu hostitelů.
- Rozdíly v druzích vektorových mšic a jejich počtu.
- Reakce na monoklonální protilátky specifické proti jednotlivým druhům.
- Rozdíly v aminokyselinových sekvencích plášťového proteinu (CP) větší než 15 % a/nebo.
- Identita celkové nukleotidové sekvence CP menší než 75 % obecně indikuje odlišný druh.

### 3.1.1 Morfologie a struktura virionů zástupců čeledi *Nanoviridae*

Zástupci čeledi *Nanoviridae* jsou charakterističtí svými malými neobalenými viriony, jež dosahují v průměru 17–20 nm a jsou ikosahedrální symetrie, jedná se tedy o dvacetistěn složený z rovnostranných trojúhelníků, obrázek 1 a 2. Kapsida virové částice je složena z 60 kapsomer tvořených stejným plášťovým proteinem (CP). Viriony mají angulární až hexagonální tvar (Chu *et Helms*, 1988; Lal *et al.*, 2020b; Thomas *et al.*, 2021; Wu *et Su*, 1990).



**Obrázek 1:** Virové částice *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) (převzato a upraveno z ICTV, 2021).

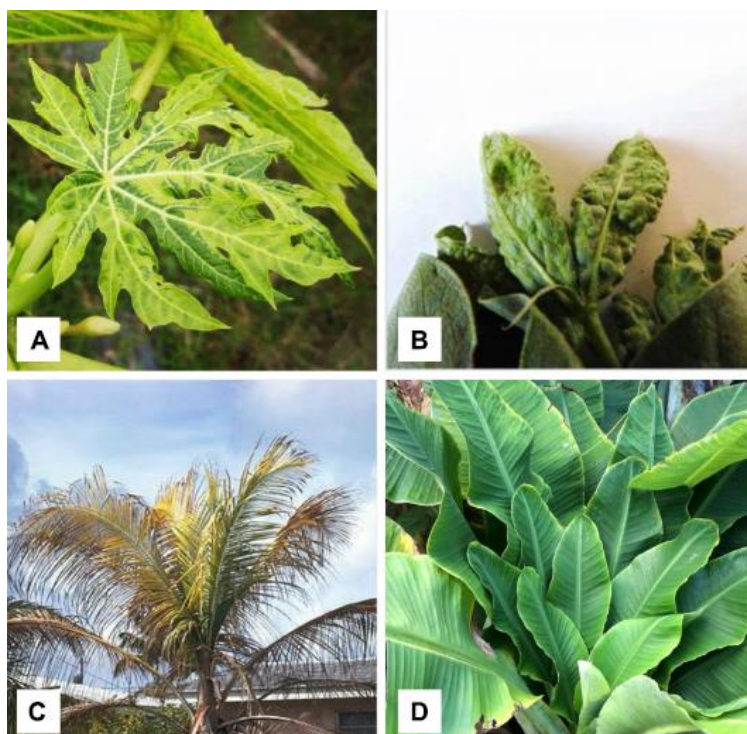


**Obrázek 2:** Schéma stavby virionů zástupců čeledi *Nanoviridae* (převzato z ViralZone, 2020).

### 3.1.2 Biologické vlastnosti zástupců čeledi *Nanoviridae*

Zástupci čeledi *Nanoviridae* se vyskytují pouze ve floému. Floém je součástí vodivých pletiv rostlin a zajišťuje převážně přesun produktů fotosyntézy do celé rostliny, díky čemuž se viry mohou jednoduše šířit dále od místa průniku (Grigoras, 2018).

Mezi symptomy, které se projevují u rostlin napadených zástupci čeledi *Nanoviridae*, se řadí zakrnělost infikované rostliny, stáčení listů, chlorózy a celkové žloutnutí listů. U rodu *Babuvirus* se také mohou objevit na listech tmavě zelené pruhy a jiné pruhovité mozaiky, příklady symptomů jsou uvedeny na obrázku 3. Infekce může vést až k předčasnému uhynutí samotné rostliny (Lal *et al.*, 2020b; Magee, 1927; Thomas, 2019; Vetten, 2009).



**Obrázek 3:** Symptomatické rostliny napadené zástupci čeledi *Nanoviridae* (převzato z Lal *et al.*, 2020b).

(A) žloutnutí listů a zakrslost u papáji, (B) nekrózy u fazole obecné, (C) poškození listů u kokosové palmy, (D) rostlina banánu vykazující symptomy onemocnění ‚bunchy top‘.

V přirozených podmínkách jsou zástupci čeledi *Nanoviridae* přenášeni různými druhy mšic, *Pentalonia nigonervosa*, *Micromyzus kalimpongensis*, *Aphis craccivora*, *Aphis*

*gossypii*, *Acyrtosipon pisum*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, a samotný přenos probíhá perzistentním nepropagativním způsobem (Lal *et al.*, 2020b; Sicard *et al.*, 2015; Vetten *et al.*, 2016). Vektorový přenos ale pravděpodobně vyžaduje určitý pomocný faktor, který je kódovaný samotným virem. Jedním z hypotetických pomocných faktorů je protein NSP (Grigoras *et al.*, 2018; Lal *et al.*, 2020b). Mechanický přenos ani přenos semeny nebyl dosud potvrzen. Jedinou výjimkou se stal úspěšný experimentální přenos infekčních klonů FBNYV biolistickou metodou (Grigoras *et al.*, 2014; Timchenko *et al.*, 2006).

Zástupci čeledi *Nanoviridae* mají omezený okruh hostitelů a oba rody se v hostitelském okruhu i geografickém rozšíření velmi odlišují. Zástupci rodu *Nanovirus* infikují primárně luštěniny z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), zatímco babuviry byly dosud identifikovány v rostlinách čeledi banánovníkovitých (*Musaceae*) a čeledi zázvorníkovitých (*Zingiberaceae*) (Abraham *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2008; Burns *et al.*, 1995; Franz *et al.*, 1997; Grigoras *et al.*, 2010; Mandal *et al.*, 2004).

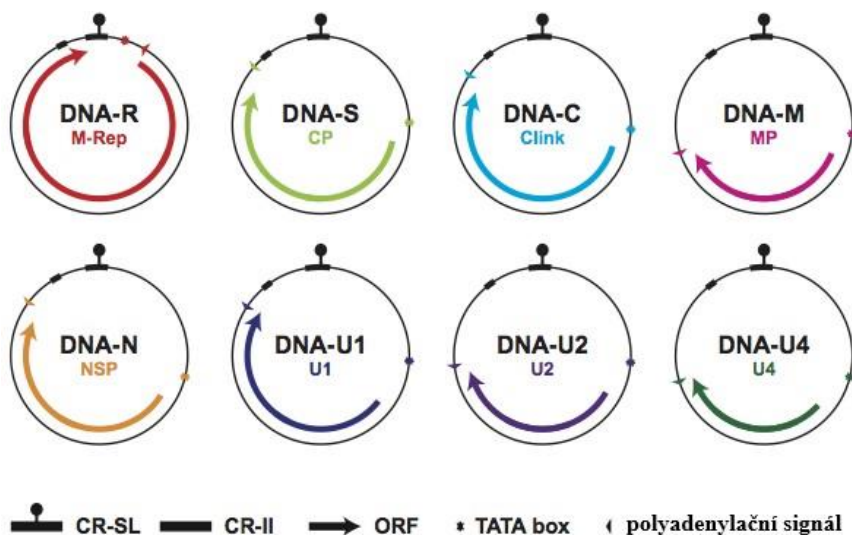
Okruh hostitelů rodu *Nanovirus* se ale stále rozšiřuje a to nejen v rámci dvouděložných rostlin čeledi bobovitých (*Fabaceae*), ale například nanovirus milk vetch dwarf virus (MDV) byl detekován u zástupců čeledi papájovitých (*Caricaceae*) a lilkovitých (*Solanaceae*), ale také u čeledi liliovitých (*Liliaceae*) (Lal *et al.*, 2018; Lal *et al.*, 2020a).

I když je okruh hostitelů zástupců čeledi *Nanoviridae* omezený, hlášení o jejich přítomnosti v různých zemích světa stále přibývá. Jejich výskyt byl zaznamenán v Asii (Malajsie, Filipíny, Indie, Japonsko, Čína, Írán, Korea), Evropě (Francie, Německo, Rakousko), Africe (Etiopie, Maroko) a Austrálii. Žádný ze zástupců nebyl dosud nalezen na americkém kontinentu (Abraham *et al.*, 2010; Abraham *et al.*, 2012; CABI, 2020; Gaafar *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2015; Grigoras *et al.*, 2014; Hassan-Sheikhi *et al.*, 2020; Heydarnejad *et al.*, 2017; Lal *et al.*, 2018; Lal *et al.*, 2020b; Makkouk *et al.*, 2009; Mandal *et al.*, 2004; Sharman *et al.*, 2008; Thomas, 2008; Vetten *et al.*, 2019).

### **3.1.3 Organizace genomů zástupců čeledi *Nanoviridae* a jejich replikace**

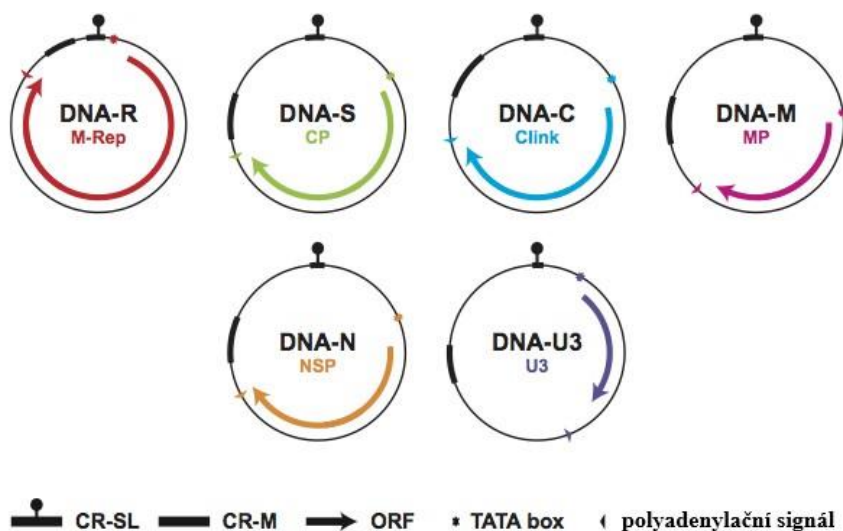
Genom zástupců čeledi *Nanoviridae* je složen z šesti (rod *Babuvirus*) nebo osmi (rod *Nanovirus*) segmentů o velikosti 923–1114 nt tvořených pozitivně orientovanou jednovláknovou kruhovou monocistronickou DNA (ssDNA), obrázek 4 a 5. Jeden segment

kóduje vždy pouze jeden protein (Beetham *et al.*, 1999; Gronenborn, 2004; Halbert *et Baker*, 2015; Katul *et al.*, 1998).



**Obrázek 4:** Schéma organizace genomu zástupců rodu *Nanovirus* (převzato a upraveno z ICTV, 2021).

M-Rep: iniciační replikační protein, CP: plášťový protein, Clink: Clink protein, MP: ‚movement‘ protein, NSP: ‚nuclear shuttle‘ protein, ORF: otevřený čtecí rámeček



**Obrázek 5:** Schéma organizace genomu zástupců rodu *Babuvirus* (převzato a upraveno z ICTV, 2021).

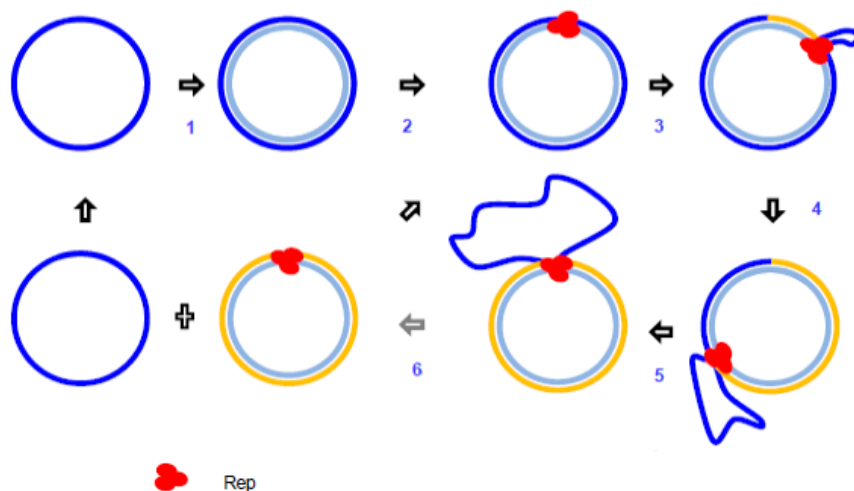
M-Rep: iniciační replikační protein, CP: plášťový protein, Clink: Clink protein, MP: ‚movement‘ protein, NSP: ‚nuclear shuttle‘ protein, ORF: otevřený čtecí rámeček

Segment DNA-R kóduje iniciační replikační protein (M-Rep) o velikosti 33,1–33,7 kDa, DNA-S kóduje plášťový protein (CP) o velikosti 18,7–19,6 kDa, DNA-C kóduje Clink protein o velikosti 18,5–19,9 kDa, který souvisí s regulací buněčného cyklu hostitelské buňky, DNA-M kóduje ‚movement‘ protein (MP) o velikosti 12,7–13,7 kDa, který zajišťuje pohyb virových částic z buňky do buňky, a DNA-N kóduje ‚nuclear shuttle‘ protein (NSP) o velikosti 17,3–17,7 kDa. U zástupců čeledi *Nanoviridae* se vyskytují další čtyři segmenty pojmenované DNA-U1, DNA-U2, DNA-U3 a DNA-U4, které kódují proteiny o neznámé funkci, konkrétně proteiny U1 o velikosti 16,9–18,0 kDa, U2 o velikosti 14,2–15,4 kDa, U3 o velikosti 10,3 kDa a U4 o velikosti 10 nebo 12,5 kDa. U banana bunchy top virus (BBTV) byl identifikován i protein U5 o neznámé funkci, jehož otevřený čtecí rámec je vnořený do otevřeného čtecího rámce kódujícího M-Rep (Gronenborn *et al.*, 2011; Lal *et al.*, 2020b; Vetten, 2009; Wickramaarachchi *et al.*, 2016).

Jednotlivé segmenty mají velice podobnou organizaci, obsahují kmenovou smyčku obklopenou konzervativními invertovanými repeticemi, která je složena z CR-SL smyčky a CR-M oblasti u rodu *Babuvirus* nebo CR-II u rodu *Nanovirus*. Každou oblast kódující virový protein předchází promotorová sekvence s TATA boxem a je ukončena polyadenylačním signálem. U nanovirů byla popsána u segmentu DNA-R odlišnost struktury, polyadenylační signál se nenachází za kódující oblastí, ale mezi TATA boxem a začátkem ORF. Toto uspořádání vede k transkripci replikačního počátku a syntéze terminálně redundantní mRNA, která je schopná vázat se do sekundárních struktur nukleových kyselin. Hypoteticky se může jednat o jednu z možných cest regulace exprese proteinu M-Rep (Gronenborn *et al.*, 2011; Hu *et Yeh*, 2011; ICTV, 2021).

Virové DNA se replikují v jádře hostitelských buněk pomocí valivé kružnice za vzniku transkripčně a replikačně aktivních meziproductů dvouvláknové DNA (dsDNA), obrázek 6. K syntéze virové dsDNA dochází po rozbalení viru za pomoci hostitelské DNA polymerázy a virových primerů (Gronenborn, 2004). Na základě znalostí o příbuzných geminivirech se předpokládá, že u čeledi *Nanoviridae* dochází k asociaci dsDNA produktů s histonovými proteiny a vzniku minichromozomů (Abouzid *et al.*, 1988; Pilartz *et Jeske*, 1992; Pilartz *et Jeske*, 2003). Samotná replikace virové DNA je iniciována proteinem M-Rep, který štípe vlákno DNA v místě replikačního počátku (*v-ori*) (Timchenko *et al.*, 1999). Průběžně jak je syntetizováno nové vlákno, to původní je postupně vytlačováno až do okamžiku, kdy se konce řetězců navzájem ligují za vzniku kruhových ssDNA řetězců (Martin *et al.*, 2011a).





**Obrázek 6:** Schéma mechanismu replikace valivou kružnicí (převzato z Martin *et al.*, 2011a).

Rep: iniciační replikační protein

Virový počátek replikace (v-ori) je tvořen konzervativní sekvencí TATTATTAC nebo TAGTATTAC ohraničenou invertovanými repeticemi tvořící kmenovou smyčku. Nekódující oblasti všech zástupců čeledi *Nanoviridae* sdílejí vysoce konzervativní oblast CR-SL, která zahrnuje i krátké repetitivní sekvence (iterony), u nichž je předpokládáno, že jsou vazebným místem pro M-Rep protein. Všechny ostatní proteiny nutné pro replikaci jsou poskytovány hostitelskou buňkou (Herrera-Valencia *et al.*, 2006; Timchenko *et al.*, 1999; Timchenko *et al.*, 2000; ICTV, 2021).

U zástupců čeledi *Nanoviridae* bylo zjištěno, že se v jedné infikované hostitelské buňce nemusí vyskytovat všechny segmenty genomu. Příkladem jsou genomové segmenty faba bean necrotic stunt virus (FBNSV), které se akumulují nezávisle v různých buňkách a kompletují se napříč buňkami. Tato skutečnost naznačuje, že přítomnost všech virových segmentů genomu v jedné konkrétní buňce není pro vyvolání infekce nutná, ale že dochází k vyvolání infekce v rámci mnohobuněčného pletiva (Sicard *et al.*, 2013; Sicard *et al.*, 2016; Sicard *et al.*, 2019). Všechny genomové segmenty musí dosáhnout specifického počtu kopií, aby mohla propuknout infekce. Ale přesto se některé genomové segmenty zástupců čeledi *Nanoviridae* vyskytují s nízkou frekvencí a některé naopak dominují. Tato variabilita počtu kopií genomových segmentů je specifická pro jednotlivé hostitele (Hastings *et al.*, 2009; Sicard *et al.*, 2013; Stranger *et al.*, 2007).

U většiny izolátů zástupců čeledi *Nanoviridae* byly nalezeny nejen tyto základní genomové segmenty, ale také až čtyři další alfasatelitní ssDNA o velikosti 1000–1100 nt, které jsou zařazeny do jiné čeledi, *Alphasatellitidae*. Alfasatelity mají odlišnou strukturu než klasické cirkulární ssDNA zástupců čeledi *Nanoviridae* a kódují vlastní Rep protein, který je vývojově odlišný od M-Rep proteinu nanovirů i babuvirů. Dokáží se tedy replikovat samostatně a nezávisle na základních genomových segmentech zástupců čeledi *Nanoviridae*. Očekává se, že tyto satelitní ssDNA mohou modulovat expresi symptomů způsobených infekcí zástupců čeledi *Nanoviridae* (Briddon *et al.*, 2012; Briddon *et al.*, 2018; Gronenborn, 2004; Timchenko *et al.*, 1999; Timchenko *et al.*, 2000; Vetten, 2008).

### **3.2 Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV)**

*Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), zástupce rodu *Nanovirus*, čeledi *Nanoviridae*, je závažným patogenem, který napadá především hrách setý (*Pisum sativum* L.), ale na základě podobných symptomů byl detekován také v čočce jedlé (*Lens culinaris* Medik.), bobu obecném (*Vicia faba* L.) a vikvi seté (*Vicia sativa* L.) (Grigoras *et al.*, 2010; Gaafar *et al.*, 2016).

#### **3.2.1 Biologické vlastnosti viru**

Typické symptomy, které PNYDV vyvolává u bobovitých rostlin, jsou stáčení a žloutnutí listů, zabarvování vrcholu do žluta, zakrslost a velice rychlé uhynutí rostliny (Grigoras *et al.*, 2010), obrázek 7. Rostliny často nebývají napadeny pouze PNYDV, ale vyskytují se u nich směsné infekce, např. infekce pea enation mosaic virus (PEMV), nebo infekce zástupci rodu *Polerovirus* a zástupci čeledi *Potyviridae* (Saucke *et al.*, 2018).





**Obrázek 7:** PNYDV infikované rostliny hrachu setého (vlevo a vpravo) a kontrolní rostlina (uprostřed) (foto: LMBM, KBB PřF).

U bobu obecného bylo popsáno i typické rozložení infekce na poli, kdy je infikovaná oblast členěna do tří částí: symptomatické jádro, periferie a oblast zahrnující nesymptomatické zdravé rostliny. Jádro má kruhovitou strukturu a je tvořeno sterilními, silně zakrslými a umírajícími nekrotickými jedinci. Kolem tohoto černého jádra se pak nachází periferie, kruh rostlin žlutého zbarvení, které se odlišují a postupně odumírají, ale nejsou zakrslé, dosahují standardního vzrůstu, obrázek 8 (Saucke *et al.*, 2018).



**Obrázek 8:** Fotografie pole bobu obecného (*Vicia faba* L.) napadeného PNYDV (převzato ze Saucke *et al.*, 2018).

PNYDV je přenášen pomocí mšic napadajících luštěniny perzistentní (nepropagativní) cirkulativní cestou. Virus se dostává do trávicího traktu hmyzího vektoru sáním nainfikované rostlině, ve kterém cirkuluje a množí se, na závěr se přesouvá do slinných kanálků, odkud může dojít k přenosu na další rostlinu. Pokud má hmyzí vektor v sobě částice PNYDV je následně infekční po celou dobu svého života (Krenz *et al.*, 2017). Vektory PNYDV jsou kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum*), mšice maková (*Aphis fabae*) a mšice vojtěšková (*Aphis craccivora*). Potenciálně mohou existovat další zástupci mšic, kteří jsou schopni PNYDV přenášet, ale dosud nebyli popsáni (Cockbain *et Costa*, 1973; King *et al.*, 2012; Makkouk *et Kumari*, 2009; Ziebell, 2017).

Další možné způsoby přenosu, např. mechanický přenos, přenos semeny nebo přenos kontaktem listů či kořenů, stejně tak přenos podzemními vektory, nebyly dosud potvrzeny, ale nejsou vyvráceny (Saucke *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Geografická distribuce viru

V roce 2009 byl v Německu pozorován masivní úhyn hrachu setého. Na základě ELISA testů došlo k prvotní detekci a popisu nového zástupce rodu *Nanovirus*, PNYDV (Grigoras *et al.*, 2010). Postupně byl PNYDV detekován v Rakousku a v Nizozemsku, následně byl identifikován také v Dánsku (Gaafar *et al.*, 2016; Gaafar *et al.*, 2017; Gaafar *et al.*, 2018). Doposud publikovaný výskyt PNYDV je vyobrazen na obrázku 9.



**Obrázek 9:** Mapa výskytu pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) (převzato z CABI, 2020).

oranžové body: místo detekce PNYDV

PNYDV se v posledních letech rychle rozšiřuje. Toto šíření může být způsobeno slabšími zimami v centrální Evropě, díky nimž anholocyklické kmeny vektorových mšic (např. kyjatka hrachová) snadněji přežívají. Anholocyklické mšice jsou původní kmeny mšic z jižní Evropy, které nemají úplný vývojový cyklus a celoročně se množí pouze partenogeneticky. Nymfy nejsou pak schopny přežít delší mrazivá období, letální jsou poklesy teplot pod  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  trvající nepřetržitě několik dní (Fryč *et Rychlý*, 2016; Rychlý, 2020). Jejich přežití následně vede k rozšíření letového období mšic a účinnějšímu šíření viru. Alternativním faktorem nadměrného šíření PNYDV je zvyšující se hustota luštěninových polí ve střední Evropě (Gaafar *et al.*, 2016; Gaafar *et al.*, 2017; Saucke *et al.*, 2018; Ziebell, 2017).

### 3.2.3 Virové proteiny PNYDV a jejich funkce

PNYDV je typický zástupce nanovirů, jehož genom se skládá z pěti základních (R, S, C, M, N) a jedné až tří vedlejších (U1, U2, U4) kruhových ssDNA o velikosti okolo 1 kb. Každá monocistronická molekula kóduje stejně jako v případě jiných nanovirů jeden konkrétní protein, ale funkce některých z nich ještě není plně známa (Hogenhout *et al.*, 2008; Krenz *et al.*, 2017; Sicard *et al.*, 2015).

DNA-R kóduje hlavní replikační iniciační protein (M-Rep) o velikosti 33–34 kDa a je lokalizován v jádru s výjimkou jádérka. Přenos M-Rep proteinu do jádra je zprostředkován pomocí jaderného lokalizačního signálu (NLS), o motivu RKKR, který byl predikován v centrální oblasti proteinu v pozici 144–147. Tento multifunkční protein rozeznává počátek virové replikace a iniciuje replikaci podobným mechanismem, jako je popsán u zástupců virů rodu *Geminivirus*. Rep proteiny iniciují replikaci v jádře štípáním konzervativní sekvence ohraničené invertovanými repeticemi (IR) v místě počátku replikace (*v-ori*). Samotná replikace probíhá mechanismem valivé kružnice (Gronenborn, 2004; Grigoras *et al.*, 2008; Krenz *et al.*, 2017; Laufs *et al.*, 1995; Timchenko *et al.*, 1999; Timchenko *et al.*, 2000).

DNA-S kóduje plášťový protein (CP) o velikosti 19 kDa, který je lokalizován v jádře a také v jádérku hostitelské buňky. Plášťový protein slouží k tvorbě virové částice, která má ikosahedrální tvar o průměru 18–19 nm. U CP byla predikována jaderná lokalizační sekvence v pozici 4 až 25 aminokyselinové sekvence (Krenz *et al.*, 2017; ViralZone, 2020; Wanitchakorn *et al.*, 1997).

DNA-C kóduje Clink protein („cell-cycle link“) o velikosti 20 kDa, který je svou funkcí mezi rostlinnými viry velmi unikátní. Clink proteiny jsou lokalizovány, jak v jádře, tak v cytosolu. Tyto proteiny obsahují ve své sekvenci LxCxE motiv, kterým se dokáží vázat na rostlinné homology savčího retinoblastomového proteinu (RBR). Clink proteiny se kromě RBR dále váží na hostitelský protein podobný SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) pomocí F-box motivu. SKP1 je člen SCF komplexu, který je součástí na ubiquitinu závislé degradaci 26S proteazomem. Tento komplex hraje důležitou roli při přechodu buňky z G1 do S fáze. Cílový protein proteazomu však není známý. Clink protein tedy může nejen stimulovat virovou replikaci, ale může také působit jako modulátor virového buněčného cyklu. Replikace nanovirů na tomto proteinu ale není plně závislá, Clink protein pouze zvyšuje její účinnost (Aronson *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 1996; Krek, 1998; Krenz *et al.*, 2017; Lageix *et al.*, 2007, Patton *et al.*, 1998).

DNA-M kóduje „movement“ protein (MP), který zajišťuje pohyb virové částice z buňky do buňky. Nacházejí se v okolí jádra a na okraji buňky a jejich lokalizace se výrazně podobá lokalizaci proteinu *Arabidopsis thaliana* Synaptotagmin 1 (ICTV, 2021; Krenz *et al.*, 2017; Pérez-Sancho *et al.*, 2015).

DNA-N kóduje „nuclear shuttle“ protein (NSP) lokalizovaný v jaderné cytoplasmě. Mezi nově identifikovaného interakčního partnera NSP se řadí Ras-GAP SH3-domain-binding-like protein objevený u *Arabidopsis thaliana* (AtG3BP), na kterém závisí sestavování tzv. stresových granulí (SG). Stresová granula jsou dynamické struktury v cytoplasmě, které se začínají tvořit při působení vnějšího stresu a vedou k celkovému snížení genové exprese. Po odeznění buněčného stresu dochází k rozpadu SG a genová exprese se obnoví do původního stavu. Při navázání NSP na AtG3BP dochází k inhibici vzniku komplexu SG a umožňuje tím efektivnější virovou infekci (Buchan *et Parker*, 2009; Krapp *et al.*, 2017; Krenz *et al.*, 2017).

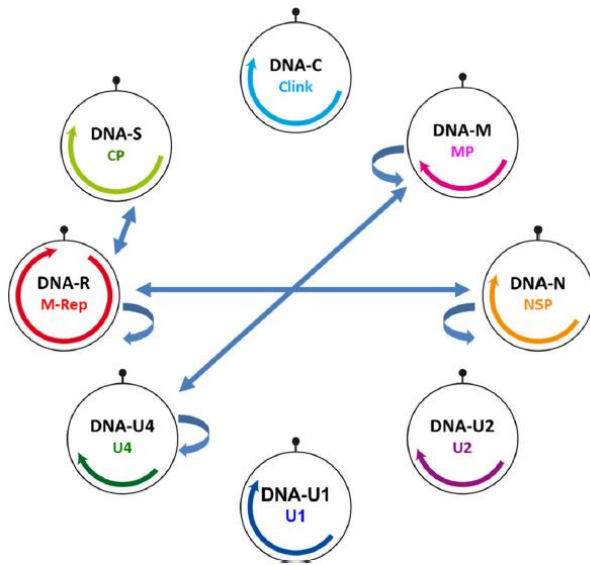
DNA-U1, -U2 a -U4 kódují proteiny o zatím neznámé funkci. Protein U1 se vyskytuje uvnitř jádra. Jeho částečná podobnost C-terminální oblasti s proteinem REn geminivirů naznačuje, že může napomáhat při regulaci virové replikace. Podle jiné hypotézy se ale tento protein zapojuje i do virového transportu. Protein U2 je lokalizován na periferiích jádra a protein U4 se vyskytuje na okraji buňky případně v okolí jádra, což připomíná umístění typické pro endoplazmatické retikulum. Ztráta U4 proteinu nemění u rostliny žádným způsobem průběh infekce, ale přesto zatím nebyl nalezen izolát, u kterého by segment DNA-U4 chyběl. Je tedy možné, že protein U4 poskytuje viru selektivní

výhodu, může být sice postradatelný u infekce hrachu setého nebo bobu obecného, ale naopak může být důležitým faktorem pro jiného hostitele, který dosud nebyl identifikován (Krenz *et al.*, 2017; Settlage *et al.*, 2005).

U proteinů MP a U4 jsou predikovány transmembránové domény v oblasti aminokyselin 25–47, nebo 7–29, což může vysvětlovat jejich výskyt v místech cytoplazmatické membrány nebo endoplazmatického retikula (Krenz *et al.*, 2017).

Mezi proteiny PNYDV dochází k vzájemným interakcím, zatím jich bylo identifikováno sedm, obrázek 10. M-Rep protein interaguje v jádře sám se sebou za tvorby oligomerové formace, podobně jako Rep proteiny geminivirů, ale navíc interaguje i s proteinem NSP a CP, což může hrát roli v životním cyklu viru. Jedna z hypotéz říká, že NSP a CP proteiny dokáží regulovat replikaci právě pomocí interakce s M-Rep podobně jako to dělá protein REn geminivirů. Dále bylo potvrzeno, že protein NSP interaguje v nukleoplasmě i sám se sebou. Může se jednat o pomocnou strukturu nezbytnou pro správný přenos viru mšicemi. Interakce MP-MP byla pozorována v blízkém okolí jádra, na periférii a jako vezikulám podobné struktury různorodé velikosti. MP dále interaguje s proteinem U4 se stejnou lokalizací. Interakce proteinů U4 navzájem byla pozorována u endoplazmatického retikula (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Krenz *et al.*, 2011; Krenz *et al.*, 2017).

MP-U4 proteinový komplex byl kolokalizován společně s proteinovým markerem endoplazmatického retikula. Tento komplex se odlišuje svým tvarem, velikostí i umístěním od signálů samotných proteinů (Krenz *et al.*, 2017).



**Obrázek 10:** Souhrnné schéma interakcí proteinů PNYDV (převzato z Krenz *et al.*, 2017).

M-Rep: iniciační replikační protein, CP: plášťový protein, Clink: Clink protein, MP: ‚movement‘ protein, NSP: ‚nuclear shuttle‘ protein

### 3.3 Rekombinace u ssDNA virů

Rekombinace společně s bodovými mutacemi je jedna z hlavních hybných sil v evoluci mnoha virů, u kterých zlepšuje adaptační schopnost a zvyšuje fitness. Také ale funguje jako klíčový mechanismus při opravě zlomů v DNA a jako obrana před akumulací škodlivých mutací. Dříve se zastával názor, že RNA viry v porovnání s DNA viry jsou schopné evoluce mnohem rychleji, ale aktuální výzkum potvrdil, že ssDNA viry mutují se srovnatelným tempem a v některých oblastech genomu dokonce i rychleji (Felsenstein, 1974; Martin *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2011a).

U ssDNA virů se vyskytují tři typy rekombinací. Prvním typem je homologní rekombinace, kdy dochází k nahrazení sekvence v genomu homologní sekvencí. Druhým typem je nehomologní rekombinace, během níž dochází ke spojení dvou odlišných sekvencí. Může docházet k duplikaci, delecii nebo inzerci virových sekvencí a dokonce může dojít k vložení virových sekvencí do genomu hostitelských buněk. Posledním typem rekombinací je genetické přeskupování genomu, nazývané také pseudorekombinace, během něhož se vyměňují celé genomové komponenty multipartitních ssDNA virů (Martin *et al.*, 2011a).

K rekombinaci může docházet různými mechanismy a ne všechny z nich jsou důkladně popsány. Příkladem může být narušení replikace střetem transkripčních enzymových komplexů s těmi replikačními, případně může být replikace zastavena jednořetězovými zlomy v templátovém vlákne u replikačně aktivní dsDNA, kdy dojde k předčasnému oddělení replikačních enzymů. Oddělené replikační enzymy následně mohou opětovně nasednout na jinou molekulu DNA za vzniku rekombinanta vytvořeného mechanismem nazývaným ‚copy-choice‘ (Martin *et al.*, 2011a; Owor *et al.* 2007).

Další možnou variantou je rekombinace vzniklá za pomoci hostitelských opravných mechanismů. V infikovaných buňkách se vyskytuje velké množství kruhových dsDNA molekul, u kterých může dojít k dvouřetězovým zlomům. Tyto zlomy aktivují reparační mechanismy buňky hostitele a dojde k opravě pomocí homologní rekombinace (Jeske *et al.* 2001; Xu *et al.* 2011).

Přeskupování genomu (‚genetic reassortment‘) je běžným jevem u virů se segmentovaným genomem, kteří tímto způsobem mohou zvyšovat svoji virulenci, rozšiřovat okruh hostitelů či překonávat rezistenci hostitele a celkově tedy zvyšovat svoji fitness. Aby ale byli nově vzniklí rekombinanti životaschopní, musí nově získané segmenty genomu správně interagovat s ostatními virovými komponenty, například s replikačním proteinem či ‚movement‘ proteiny. V opačném případě nemusí docházet ke správné replikaci či přenosu virových částic (Grigoras *et al.*, 2014; Martin *et al.* 2011a; Stainton *et al.*, 2012, Sung *et al.* 1995).

K rekombinaci nemusí docházet jen mezi viry samotnými, ale může dojít k přenosu genetického materiálu mezi ssDNA viry a jejich hostiteli. Nevirové DNA původem z hostitelských rostlin byly objeveny u zástupců čeledi *Geminiviridae*. K tomuto přenosu genetického materiálu ale dochází i opačným směrem, kdy se integrují fragmenty virové DNA do hostitelských chromozomů. V minulosti došlo k četným případům, kdy se virová ssDNA začlenila do genomů živočišných, rostlinných i prokaryotických druhů. Příkladem může být začlenění DNA geminiviru do genomů zárodečných linií rostlin rodu tabáku (*Nicotiana L.*), ke kterému podle odhadů došlo před 0,2 až 5 miliony let (Ashby *et al.*, 1997; Belyi *et al.*, 2010; Lefeuvre *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011a; Murad *et al.*, 2004; Saunders *et al.* Stanley, 1999).

Rychlost rekombinace a přeskupování genomu je ovlivněno tím, jak moc často se jednotlivé druhy a kmeny virů potkávají v jádrech hostitelských rostlin. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují četnost rekombinací, patří: geografické rozšíření, epidemiologické cykly, okruh hostitelů a tkáňové tropismy (Martin *et al.*, 2011a).

Místa rekombinace detekovaná v genomech ssDNA virů nejsou distribuována náhodně, ale naopak se se zvýšenou frekvencí vyskytují v tzv. ‚hot spotech‘. Mezi ‚hot spoty‘ u ssDNA virů se řadí například virový počátek replikace (v-ori) nebo sekundární struktury. Rekombinace se také mnohem častěji vyskytují v nekódujících oblastech na okrajích genů, kde nejsou na rozdíl od rekombinací v kódujících oblastech natolik škodlivé. Rekombinace v kódujících oblastech mohou mít za následek špatné skládání výsledného proteinu, či jeho zkrácení a následnou nefunkčnost (Lefeuvre *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2011a; Martin *et al.*, 2011b).

### **3.3.1 Rekombinace u čeledi *Nanoviridae***

K rekombinacím dochází u zástupců čeledi *Nanoviridae* s velmi podobnou četností a převládají rekombinace mezidruhové nad vnitrodruhovými. K rekombinacím dochází nejčastěji v nekódujících oblastech, například v místě virového počátku replikace (v-ori). U nanovirů je popsána rekombinace v nekódujících oblastech segmentů DNA-U2 a DNA-M mezi viry pea yellow stunt virus (PYSV) a faba bean yellow leaf virus (FBYLV). Naopak u babuvirů byla zaznamenána rekombinace v oblasti kmenové smyčky u genomového segmentu U3, kde se nachází replikační počátek. V této oblasti dochází k rekombinaci kmenové smyčky U3 s kmenovou smyčkou ostatních genomových segmentů. Výsledkem je lepší adaptace, kdy M-Rep protein snáze interaguje s U3 segmentem (Grigoras *et al.*, 2014; Hyder *et al.*, 2011; Staiton *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2008).

### **3.3.2 Přeskupování genomu u čeledi *Nanoviridae***

U zástupců čeledi *Nanoviridae* může opět docházet k výměně genetického materiálu jak mezi rozdílnými, tak i stejnými druhy. Nejčastěji dochází k výměně pouze jedné molekuly genomu a často se jedná o molekulu DNA-M. Naopak molekuly DNA-S a DNA-C vykazují nejnižší frekvenci přeskupování. Byly popsány i životaschopné přenosy segmentů DNA-R u stejných druhů virů, ale pro přenos mezi různými druhy pravděpodobně existuje



určitá genetická bariéra. Příkladem přeskupování genomu u rodu *Nanovirus* může být prokázáný přenos segmentů DNA-M a DNA-U4 mezi různými izoláty faba bean necrotic yellows virus (FBNYV), nebo výskyt segmentů DNA-U2 u black medic leaf roll virus (BMLRV) a DNA-U4 u milk vetch dwarf virus (MDV), které byly získány z jiného druhu viru (Grigoras *et al.*, 2014; Stainton *et al.*, 2012).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Analyzováno bylo 24 vzorků hrachu setého (*Pisum sativum* L.) sbíraných v dubnu 2019 ve čtyřech oblastech a 1 vzorek hrachu setého peluška (*Pisum sativum* var. *arvense* (L.) Poir.). Seznam vzorků je uveden v tabulce 1. Odebrané listy byly lyofilizovány a následně skladovány v -80 °C.

**Tabulka 1:** Seznam testovaných vzorků.

Datum sběru	Označení vzorku	Lokalita	Hostitel	Příznaky
15. 4. 2019	1900813-1A	Jaroměřice nad Rokytnou	hrách setý	žloutnutí, odumírání, zakrslost
	1900813-1B			
	1900813-1C			
	1900813-2A			
	1900813-2C			
	1900813-3A			
	1900813-3B			
	1900813-3C			
	1900815-1B			
	1900815-1C			
	1900815-2A			
	1900815-2B			
	1900815-2C			
	1900815-3A			
	1900832-1/2	Uherský Ostroh	hrách setý	žloutnutí, odumírání, zakrslost
	1900832-1/3			
	1900832-2/1			
	1900832-2/3			
1900832-3/2				
1900832-3/3				
16. 4. 2019	1900836-1B	Chrlice	hrách setý	žloutnutí, odumírání, zakrslost
	1900836-1C			
	1900836-2A			
	1900836-2C			
23. 4. 2019	1900968-P482	Uhříněves	hrách setý peluška	žloutnutí, odumírání

## **4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky**

### **Použité chemikálie**

Agarose SERVA for DNA electrophoresis (Serva, kat.č. 11404.05)

Deionizovaná voda

GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, kat.č. 41002)

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, kat.č. SM0323)

Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide) (ThermoFisher, kat. č. H3569)

Isopropanol (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0)

### **Použité soupravy**

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, kat.č. 69104)

Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337455)

MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline kat.č. BIO-21106)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat.č. 28706)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (250) (Macherey-Nagel, kat.č. 740609.250)

### **Použité roztoky**

1% roztok ethidium bromidu ve vodě (Sigma – Aldrich, kat. č. E1510)

1x TAE pufr (40 mM Tris base, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA)

50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustit v 800 ml dH<sub>2</sub>O, přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit dH<sub>2</sub>O do 1000 ml.

## **4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení**

Analytické váhy AE240 (Mettler Toledo)

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)

Elektroforetická komora HU10 MINI (Fisherbrand)  
Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hoefer)  
Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)  
Minicentrifuga PRISM™ mini (Labnet International, Inc.)  
Laminární box PV-100 (Telstar)  
Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)  
Dokumentační systém G:BOX + software GeneSnap (SynGene)  
Přístroj na výrobu ledu (Icematic)  
Thermocycler T100™ Thermal Cyclor (BIO-RED)  
Thermocycler T personal (Biometra)  
UV transluminátor UVT-14L (Herolab)  
Váhy EK 200G (A&D Engineering)  
Vortex MS1 Minishaker (IKA)  
Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing Block MB-102 (Bioer)  
Zdroj stejnosměrného proudu MS major science, MP-250V (BioTech)

## **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.4.1 Izolace DNA**

Celková DNA byla izolována ze vzorků listů metodou adsorpce na silikátovou membránu za použití kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Maximálně 20 mg lyofilizovaného nebo 100 mg čerstvého nebo zmraženého listu bylo homogenizováno ve 400  $\mu$ l AP1 pufru a 4  $\mu$ l RNase A s použitím homogenizátoru FastPrep a lyzační matrix A. Homogenizace probíhala při intenzitě 5,0  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  po dobu 45 s. Dále bylo postupováno podle pokynů výrobce.

Koncentrace a kvalita vyizolované DNA byla stanovena spektrofotometricky, DNA byla následně dlouhodobě uchováváno v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . DNA byla v průběhu práce krátkodobě uchovávána na ledu.

#### 4.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost viru ve vzorcích byla potvrzena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Amplifikace jednotlivých segmentů genomu pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) byla provedena za použití 8 dvojic specifických primerů dle Gaafar *et al.* (2017), tj. priPeaCdir/priPeaCrev, priPeaMdir/priPeaMrev, priPeaNdir/priPeaNrev, priPeaRdir/-priPeaRrev, priPeaSdir/priPeaSrev, priPeaU1dir/priPeaU1rev, priPeaU2dir/priPeaU2rev a priPeaU4dir/priPeaU4rev. Dvojice primerů priPeaSdir/priPeaSrev a priPeaU4dir/-priPeaU4rev byly oproti originálu modifikovány a byly vytvořeny a následně použity primery degenerované. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2. Složení reakční směsi bylo pro všechny reakce stejné.

**Tabulka 2:** Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Reference
priPeaCdir	GCCGGAAGCTTGCCGACTGACGGAG	
priPeaCrev	AGCTTCCGGCAAGACGCAGTAATTG	
priPeaMdir	TACCTGAACGTCCTGTATCTT	
priPeaMrev	TCAGGTACTGAATTACTTGCC	
priPeaNdir	GAAGAACCCAGGAAGGTGTTGC	
priPeaNrev	GGTTCTTCCAATTTACCTTTCATGG	
priPeaRdir	GGAATACCAAGGTGAGTTACGG	
priPeaRrev	TATTCCTGAGAGTCCCGGAC	Gaafar <i>et al.</i>
priPeaSdir	AACC <b>W</b> CCGGATATYACCAGAT	(2017)
priPeaSrev	CCGGAGGTTTTATTTCAAACCAAC	
priPeaU1dir	TGGTGAAGAAATTGCAGGTGAT	
priPeaU1rev	TTCACCAGTTTCTCGTCAGAAC	
priPeaU2dir	GATCAAGAACAAGGTTAGTTTATG	
priPeaU2rev	TCTTGATCGGAGACGAACTGGA	
priPeaU4dir	ATCAAGTCTGAAGATG <b>MTAYG</b>	
priPeaU4rev	GACTTGATTTCAACATCTCTTTCAC	

Tučně označena modifikace primerů.

PCR reakční směs byla připravena z pufru, deionizované vody, primerů a MyTaq™ DNA polymerázy, její složení je uvedeno v tabulce 3. Její množství vždy odpovídalo počtu analyzovaných vzorků. Směs byla rozpipetována po 24 µl do 0,2 ml mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky byl dále přidán 1 µl DNA získané izolací ze vzorků listů. Amplifikace probíhala 40 cyklů za podmínek (tabulka 4): počáteční denaturace 95 °C 3 min, denaturace 95 °C 45 s, nasedání primerů v rozsahu teplot 53–66 °C v závislosti na použité kombinaci primerů (tabulka 5) 45 s, elongace 72 °C 60 s a konečná elongace 72 °C 5 min. PCR produkty byly skladovány při -18 °C.

**Tabulka 3:** Složení reakční směsi pro PCR reakci pro 1 test.

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace roztoku	Objem reagencie (µl)
pufr	5x	1x	5,00
deionizovaná voda			18,30
forward primer	20 pmol·µl <sup>-1</sup>	0,2 µmol·l <sup>-1</sup>	0,25
reverse primer	20 pmol·µl <sup>-1</sup>	0,2 µmol·l <sup>-1</sup>	0,25
MyTaq™ DNA polymeráza	5 U·µl <sup>-1</sup>	1 U	0,20

**Tabulka 4:** Podmínky PCR amplifikace.

Proces	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	45 s	
nasedání primerů	x	45 s	40
elongace	72	60 s	
konečná elongace	72	5 min	1

**Tabulka 5:** Teploty nasedání primerů.

Název primerů	Teplota (°C)
priPeaCdir/ priPeaCrev	66
priPeaMdir/ priPeaMrev	58
priPeaNdir/ priPeaNrev	56
priPeaRdir/ priPeaRrev	58
priPeaSdir/ priPeaSrev	58
priPeaU1dir/ priPeaU1rev	58
priPeaU2dir/ priPeaU2rev	54
priPeaU4dir/ priPeaU4rev	53

#### 4.4.3 Elektroforetická separace

Produkty získané pomocí PCR amplifikace byly detekovány elektroforetickou separací v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru (1x) s interkalačním barvivem GelRed Nucleic Acid Stain.

50 ml agarózového gelu bylo smícháno s 3  $\mu$ l GelRed Nucleic Acid Stain a tato směs byla nalita do vaničky o rozměru 10x10 cm. Gel byl po 30 min převrstven 1x TAE pufrem. Následně bylo do první jamky napipetováno 1,5  $\mu$ l standardu molekulové hmotnosti GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder a do následujících jamek byly napipetovány vždy 3  $\mu$ l PCR produktu.

Elektroforetická separace probíhala cca 45 min při 70 V. PCR amplikony byly detekovány pomocí UV-transluminátoru a vyfoceny dokumentačním zařízením Syngene, G:Box.

#### 4.4.4 Izolace PCR produktu

V případě, že byly získány unikátní specifické PCR produkty, byly tyto produkty izolovány přímo z roztoku pomocí kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, kdy ale byly modifikovány časy centrifugace a závěrečný eluční objem.

Reakční směsi po provedené PCR amplifikaci byly naředěny na objem 100  $\mu$ l deionizovanou vodou. NTI pufr byl naředěn v poměru 1 : 8 a následně byl přidán ke vzorkům v objemovém poměru 2 : 1, v našem případě bylo tedy přidáno 200  $\mu$ l pufru ke 100  $\mu$ l vzorku. Směs byla promíchána pipetováním a nanesena na kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce. Kolonka byla centrifugována 1 min při 11 000 rpm, filtrát byl vylit do odpadu. Následně bylo na kolonku napipetováno 600  $\mu$ l NT3 promývacího pufru a centrifugováno opět za stejných podmínek. Filtrát byl odstraněn. Tento krok byl proveden dvakrát. Dále bylo centrifugováno 2 min při 11 000 rpm pro vysušení kolonky a kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 25  $\mu$ l elučního pufru NE, směs byla inkubována 1 min při laboratorní teplotě a následně byla kolonka centrifugována 1 min při 11 000 rpm.

Pokud bylo v reakci získáno více amplikonů odlišné velikosti, byl vybrán amplikon očekávané velikosti a ten byl izolován pomocí QIAquick Gel Extraction Kit podle pokynů

výrobce, kdy byl upraven pouze poslední eluční krok. DNA byla eluována do 30  $\mu\text{l}$  deionizované vody.

Koncentrace a kvalita izolované DNA byla stanovena fluorimetricky. Získaná DNA byla následně uchovávána v  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4.5 Sangerovo sekvenování

Sekvenační značení bylo provedeno za pomoci Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit. Reakční směs byla připravena smícháním sekvenačního BigDye® pufru, BigDye® Terminator mixu a primeru o koncentraci  $1,6\text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Rozpis reakční směsi pro jeden vzorek je uveden v tabulce 6. Takto připravená reakční směs byla rozpipetována po  $4\text{ }\mu\text{l}$  do  $0,2\text{ ml}$  mikrozkušavek a bylo k ní přidáno  $6\text{ }\mu\text{l}$  vzorku DNA předem naředěné tak, aby bylo použito  $25\text{ ng}$  DNA na reakci. Každý ampikon byl osekvenován oboustranně, za použití specifických amplifikačních primerů.

**Tabulka 6:** Složení reakční směsi pro sekvenační značení pro 1 test.

Reagencie	Objem chemikálie ( $\mu\text{l}$ )
BigDye® pufř	1,00
primer	2,00
BigDye® Terminator mix	1,00

**Tabulka 7:** Podmínky sekvenačního značení.

Proces	Teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	96	1 min	1
denaturace	96	10 s	
nasedání primerů	50	5 s	40
elongace	60	4 min	

Připravené reakční směsi s DNA byly protřepány, stočeny a vloženy do thermocycleru, kde proběhla sekvenační reakce za podmínek doporučených výrobcem (tabulka 7). Produkty byly napipetovány do 96-jamkové sekvenační desky a byly analyzovány kapilárovou elektroforézou pomocí sekvenačního analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB AV ČR, CR-Haná.



#### 4.4.6 Bioinformatická analýza

Protisměrné výstupy ze sekvenátoru byly sestaveny do kontigů a následně manuálně editovány pomocí programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.). Identity získaných kontigů byly potvrzeny za pomoci programu BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) na základě porovnání se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank. Sekvence získaných segmentů byly porovnány navzájem a s odpovídajícími sekvencemi specifických DNA segmentů PNYDV izolátů dostupných v GeBank za použití p-distance analýzy programu MEGA v. 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016).

U studovaných PNYDV segmentů byla zjišťována genetická variabilita a evoluční příbuznost pomocí porovnávání získaných sekvencí se sekvencemi PNYDV izolátů dostupných v databázi GenBank (NCBI). Mnohočetný alignment sekvencí nukleotidů a aminokyselin byl vytvořen pomocí programu ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Takto získaný mnohočetný alignment byl použit pro fylogenetickou analýzu. Jako nejvhodnější byl pomocí algoritmu Modeltest vyhodnocen pro nukleotidové sekvence model Tamura 3-parametrický test a pro aminokyselinové sekvence JTT, fylogenetické analýzy byly provedeny prostřednictvím neighbor-joining algoritmu s bootstrap opakováním 500x (Felsenstein, 1985; Jones *et al.*, 1992; Saitou *et al.*, 1987; Tamura, 1992). Výsledné fylogenetické stromy byly zobrazeny pomocí programu TreeExplorer (vše MEGA v. 7.0.26).

Analýza rekombinantů byla provedena s použitím mnohočetného alignmentu všech získaných sekvencí a sekvencí PNYDV dostupných v GenBank (NCBI) v programu RDP4 za použití algoritmů RDP, GENECONV, Chimaera, MaxChi, BootScan, SiScan a 3Seq (Gibbs *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2015; Maynard Smith, 1992; Lam *et al.*, 2018; Padidam *et al.*, 1999; Posada *et al.*, 2001). Za statisticky průkazné rekombinantní molekuly byly považovány sekvence potvrzené 4 a více analytickými nástroji.

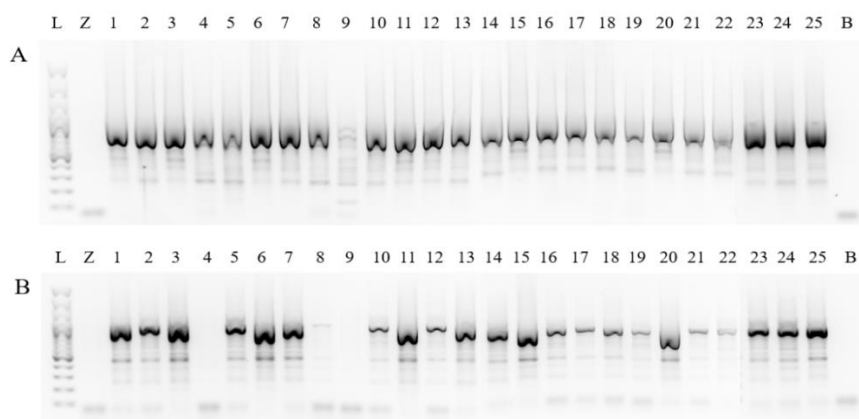
## 5 Výsledky

Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) je novým, stále ne příliš známým rostlinným virem, který nebyl dosud v České republice detekován. Díky spolupráci s laboratoří virologie, Oddělení diagnostiky škodlivých organismů rostlin, ÚKZUZ Olomouc bylo v roce 2019 získáno 35 vzorků hrachu setého (*Pisum sativum* L.) a 1 vzorek hrachu setého peluška (*Pisum sativum* var. *arvense* (L.) Poir.) vykazující typické příznaky infekce PNYDV, tj. žloutnutí listů, zakrslý růst a postupné odumírání.

Tato diplomová práce se zaměřila na molekulárně genetickou charakteristiku českých PNYDV izolátů s cílem rozšíření znalostí o genetické variabilitě tohoto závažného patogenu luštěnin.

### 5.1 Detekce a amplifikace genomových segmentů PNYDV

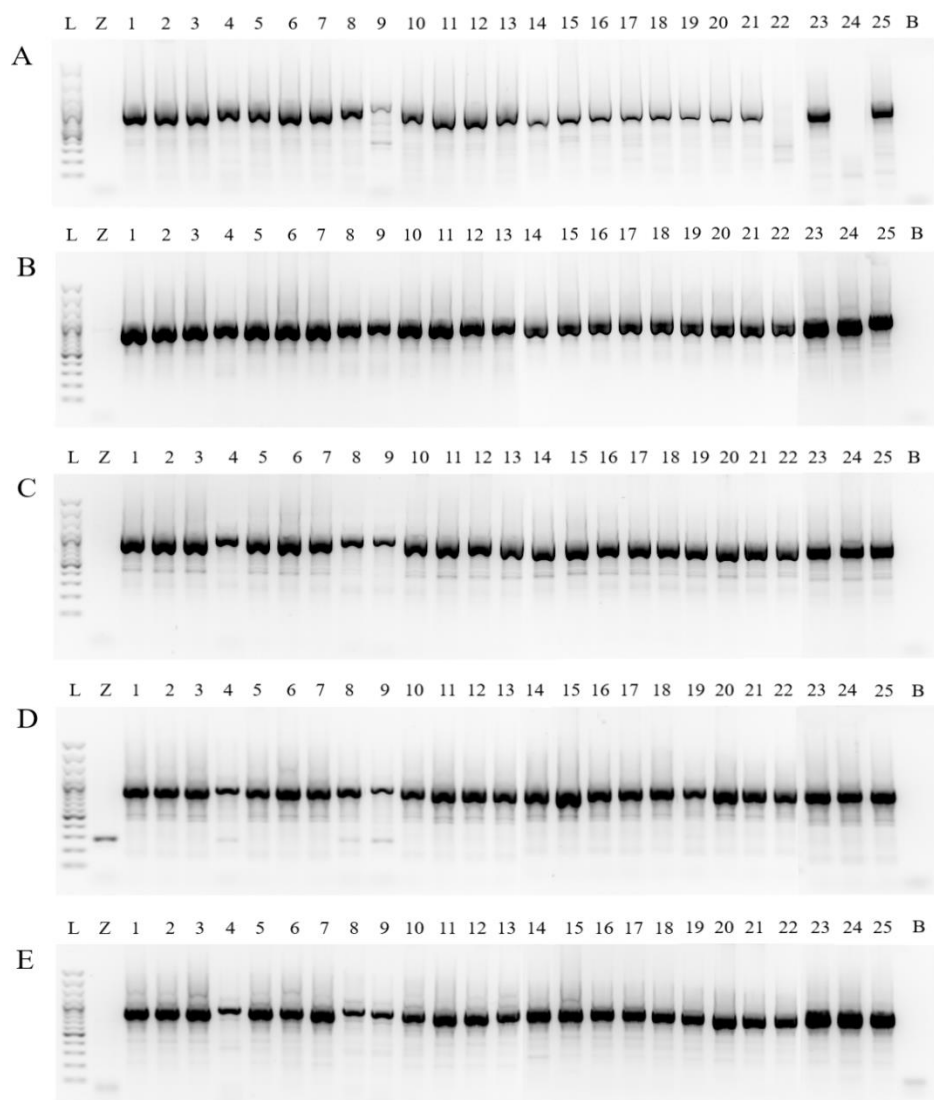
Pro analýzu bylo vybráno 25 vzorků z pěti lokalit v České republice, u nichž byla potvrzena přítomnost viru pomocí specifické PCR zaměřené na detekci genomových segmentů DNA-C a DNA-N. Oba dva virové segmenty o předpokládané velikosti 1000 bp byly úspěšně amplifikovány, obrázek 11. Genomový segment DNA-C byl amplifikován u všech testovaných rostlin a DNA-N byl detekován v 92 % případů (u 23 z 25 rostlin).



**Obrázek 11:** Detekce genomových segmentů DNA-C (A) a DNA-N (B) PNYDV.

L: standard molekulární hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder); B: slepý vzorek; Z: zdravá rostlina; 1–25: vzorky; 1–8: 1900813-1A, -1B, -1C, -2A, -2C, -3A, -3B, -3C; 9–14: 1900815-1B, -1C, -2A, -2B, -2C, -3A; 15–20: 1900832-1/2, -1/3, -2/1, -2/3, -3/2, -3/3; 21–24: 1900836-1B, -1C, -2A, -2C; 25: 1900968-P482

Následně byly amplifikovány i ostatní genomové segmenty, DNA-M, DNA-R, DNA-S, DNA-U2 a DNA-U4, obrázek 12. Všechny detekované produkty odpovídaly očekávané velikosti cca 1000 bp. Při amplifikaci genomových segmentů DNA-R, -S, -U2 a U4 byly získány produkty u všech vzorků. Genomový segment DNA-M byl amplifikován u 23 vzorků z 25.



**Obrázek 12:** Detekce PNYDV genomových segmentů DNA-M (A), DNA-R (B), DNA-S (C), DNA-U2 (D) a DNA-U4 (E) PNYDV.

L: standard molekulární hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder); B: slepý vzorek; Z: zdravá rostlina; 1–25: vzorky; 1–8: 1900813-1A, -1B, -1C, -2A, -2C, -3A, -3B, -3C; 9–14: 1900815-1B, -1C, -2A, -2B, -2C, -3A; 15–20: 1900832-1/2, -1/3, -2/1, -2/3, -3/2, -3/3; 21–24: 1900836-1B, -1C, -2A, -2C; 25: 1900968-P482

## 5.2 Charakteristika českých PNYDV izolátů

Jednotlivé genomové segmenty byly obousměrně sekvenovány pomocí amplifikačních primerů. Byly získány sekvence pokrývající většinu délky studovaných DNA molekul, přičemž u všech sekvencí nebyla získána oblast nasedání primerů o velikosti cca 43–118 bp.

Bylo získáno 23 sekvencí DNA-C o délce 907–921 bp, 21 sekvencí DNA-M o délce 891–919 bp, 20 sekvencí DNA-N o délce 886–939 bp, 24 sekvencí DNA-R o délce 917–933 bp, 25 sekvencí DNA-S o délce 894–912 bp, 25 sekvencí DNA-U2 o délce 896–923 bp a 25 sekvencí DNA-U4 o délce 861–926 bp. U pěti vzorků (1900813-3B, 1900815-2C, 1900832-1/2, -2/1, 1900836-2C) byly detekovány u některých genomových segmentů směsné infekce minimálně dvou odlišných izolátů PNYDV, a proto se nepodařilo parciální genomové sekvence získat a nebyly dále zařazeny do analýzy.

### 5.2.1 Základní motivy detekované v genomových segmentech izolátů viru

Molekuly jednotlivých genomových segmentů českých izolátů obsahovaly motivy typické pro PNYDV, jako jsou: kmenová smyčka, replikační počátek, TATA box a polyadenylační signální sekvence. Sekvence motivů a jejich pozice odpovídala druhovému popisu a ve většině případů nebyla identifikována žádná odchylka. Přehled sekvencí motivů a jejich pozic je uveden v tabulce 8. U několika izolátů byla nalezena odchylka v umístění motivů v genomu, která byla způsobena přítomností delecí či inzercí v nekódující oblasti.

V rámci kmenových smyček genomových segmentů DNA-C, -M, -N a -U2 byla opakovaně detekována na první pozici motivu substituce C→G. Záměna se vyskytovala u izolátů bez ohledu na jejich původ, u DNA-C se jednalo o izoláty 1900832-1/2, -1/3 a -3/3, u DNA-M o izoláty 1900813-3B, 1900815-1C, 1900832-3/2 a 1900968-P482, u DNA-N o izoláty 1900813-3C, 1900836-1C a 1900968-P482 a u DNA-U2 o izoláty 1900813-1C, -3C, 1900832-3/3, 1900836-1C a 1900968-P482. U izolátů DNA-M: 1900815-1B a 1900836-2A; DNA-U2: 1900815-2C a 1900832-2/1 byla tato pozice variabilní s 50% četností obou bází.

U izolátů 1900836-1B byla navíc detekována záměna v polyadenylační signální sekvenci segmentu DNA-M, substituce A→T v pozici jedna.

**Tabulka 8:** Sekvence a pozice charakteristických motivů PNYDV (pozice vztažená k předpokládané plné délce jednotlivých ssDNA).

Název motivu	Sekvence	Pozice
DNA-C		
Kmenová smyčka	C/GCTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAGG	969–989, 1–14
Počátek replikace	TAGTATTAC	983–989, 1–2
TATA box	TATAAAT	233–239
PolyA signál	AATAAA	785–790
DNA-M		
Kmenová smyčka	C/GCTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAGG	968–988, 1–14
Počátek replikace	TAGTATTAC	982–988, 1–2
TATA box	TATAAAT	237–243
PolyA signál	A/TATAAA	703–708
DNA-N		
Kmenová smyčka	C/GCTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAGG	973–993, 1–14
Počátek replikace	TAGTATTAC	987–993, 1–2
TATA box	TATAAAT	289–295
PolyA signál	AATAAATAAA	805–814
DNA-R		
Kmenová smyčka	CTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAG	983–1002, 1–13
Počátek replikace	TAGTATTAC	996–1002, 1–2
TATA box	TATATAT	55–61
PolyA signál	AATAAA	92–97
DNA-S		
Kmenová smyčka	CCTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAGG	963–983, 1–14
Počátek replikace	TAGTATTAC	977–983, 1–2
TATA box	TATAAAT	223–229
PolyA signál	AAATAAA	815–821
DNA-U2		
Kmenová smyčka	C/GCTGGCACGGGGCTTAGTATTACCCCGTGCCAGG	965–985, 1–14
Počátek replikace	TAGTATTAC	979–985, 1–2
TATA box	TATAAAT	235–241
PolyA signál	AATAAA	699–704
DNA-U4		
Kmenová smyčka	GGGAGGGGGCTTAGTATTACCCCTCCC	962–979, 1–11
Počátek replikace	TAGTATTAC	973–979, 1–2
TATA box	TATAAAA	285–291
PolyA signál	TATAAAA	741–746

## 5.2.2 Genetická analýza DNA-C

DNA-C segmenty českých izolátů vykazovaly vysokou homogenitu, vzájemná identita byla 96,4–100 %, obrázek 13. Izoláty původem ze stejné lokality vykazovaly obecně vyšší identitu než izoláty napříč lokalitami. Nukleotidové sekvence DNA-C segmentů lokality I (Jaroměřice nad Rokytnou) vykazovaly identitu 99,6–100 % s výjimkou izolátu 1900813-1A, který vykazuje 99,4% identitu s izolátem 1900836-1C z lokality IV (Chrlice). Obdobná situace byla zjištěna i u izolátů lokality II (Čáslav) (identita 99,5–100 %) a jim podobný pak byl izolát 1900968-P482 z lokality V (Uhřetěves) (99,4–100 %). Izoláty lokality III (Uherský Ostroh), konkrétně 1900832-1/2, -1/3 a -3/3, se odlišovaly výrazněji. Identita těchto izolátů navzájem byla 98,4–99,5 %, ale s izoláty předchozích lokalit sdílely identitu nižší, 96,4–98,9 %. DNA-C segmenty PNYDV izolátu z lokality IV vykazovaly opět větší variabilitu, izolát 1900836-1B vykazoval nejvyšší identitu (99,9 %) s izolátem 1900815-2B lokality II.

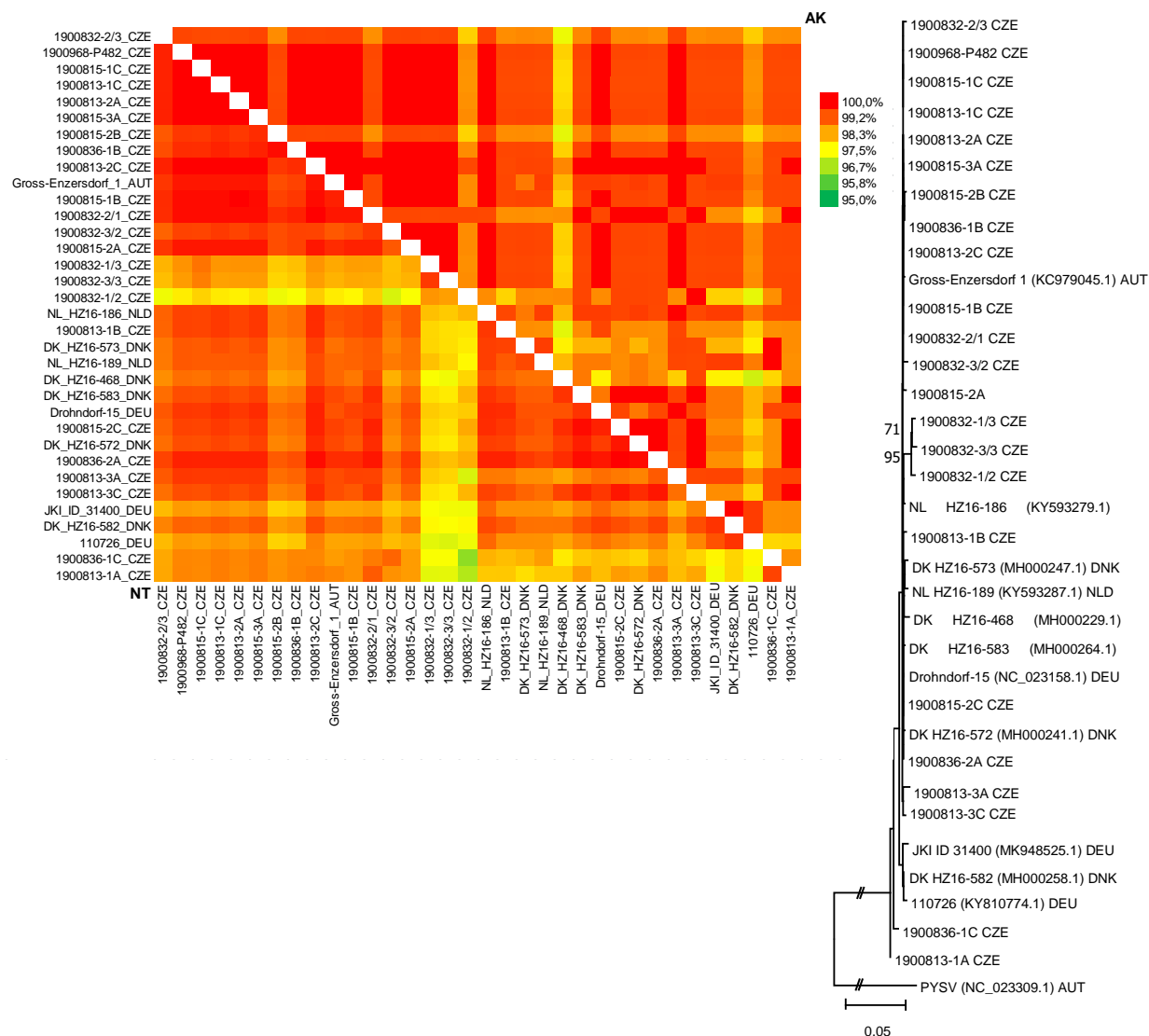
U odlišných izolátů byly identifikovány specifické inserce a delece v nekódujících oblastech segmentu ve srovnání s referenční sekvencí PNYDV DNA-C (Acc. No. NC\_023158.1), a to: inserce adeninu na pozici 139 a inserce GTTGA na pozici 152–156 u izolátů 1900813-1A a 1900836-1C; inserce guaninu (pozice 824) a tyminu (pozice 831) u izolátu 1900832-1/2; delece sekvence AATAGTGTC na pozici 933–941 vztažené k referenční sekvenci u izolátů 1900832-1/3 a 1900832-3/3; a delece adeninu v pozici 914 referenční sekvence a delece sekvence TGTTGGGGTCAAATAGTGTC v pozici 922–942 referenční sekvence u izolátu 1900832-1/2.

České izoláty vykazovaly vysokou podobnost s doposud známými dalšími evropskými izoláty, převážná většina (18 z 23) napříč všemi lokalitami vykazovala 98,2–99,8% identitu s rakouským izolátem Gross-Enzersdorf 1 (KC979045.1).

Vysokou homogenitu a odlišnost některých izolátů potvrdila i fylogenetická analýza, obrázek 13, kde tři izoláty lokality III (1900832-1/2, -1/3 a -3/3) vytvořily samostatnou statisticky průkaznou skupinu; a zároveň se samostatně vyvětvily i izoláty 1900813-1A a 1900836-1C.

Clink protein vykazuje pouze nízkou variabilitu a u většiny izolátů byl totožný, viz heat mapa na obrázku 13. Mírně odlišné se ukázaly izoláty 1900813-1B (97,2–99,3 %),

1900815-2B (97,2–99,3 %) a 1900832-2/3 (97,3–99,3 %) a evropské izoláty 110726 (97,1–99,4 %) a DK HZ16-468 (97,1–99,3 %).



**Obrázek 13:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-C segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí Clink proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

—// : přerušení větve

### 5.2.3 Genetická analýza DNA-M

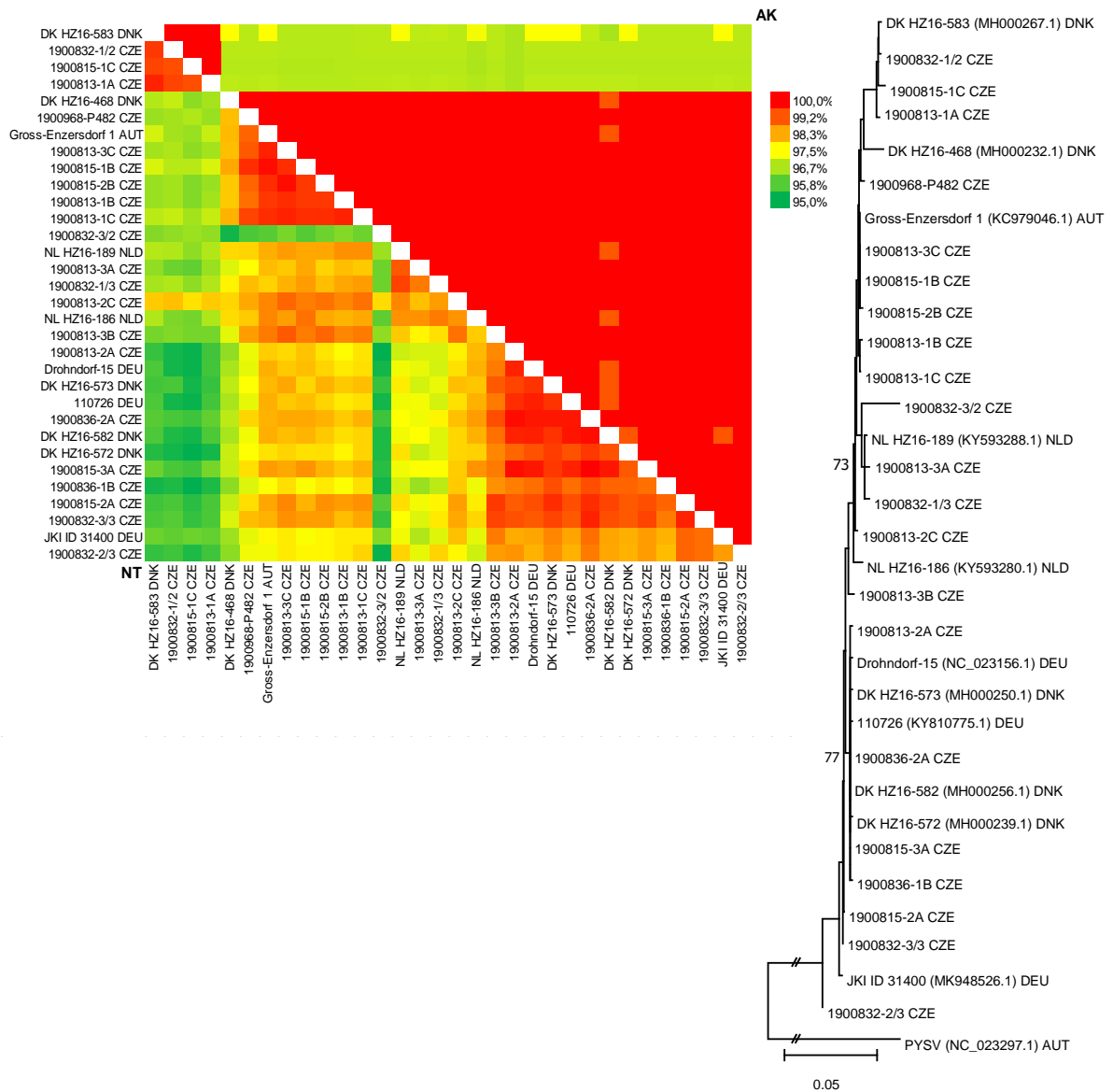
DNA-M segmenty českých izolátů byly variabilnější než ostatní segmenty, vykazovaly navzájem 94,8–100% identitu, obrázek 14. Izoláty z jednotlivých lokalit tvořily homogenní skupiny až na výjimky. Izoláty lokality I vykazovaly navzájem 99,0–99,7% identitu, od které se odlišovaly pouze izoláty 1900813-1A, -2A a -3A. Izolát 1900813-1A vykazoval nejvyšší identitu (99,2 a 99,3 %) k izolátům 1900815-1C a 1900832-1/2 z lokalit II a III. Izolát 1900813-2A byl opět nejvíce podobný (99,9 %) izolátu z lokality II, 1900815-3A, ale také izolátu z lokality IV, 1900836-2A. Poslední odlišný izolát první lokality, 1900813-3A, sdílel 98,8% identitu s izolátem 1900832-1/3 z lokality III. U izolátů lokality II byla situace podobná, vzájemná identita byla 98,2–99,4 % s výjimkou již zmiňovaného izolátu 1900815-1C. Izoláty lokality III byly nejvariabilnější a navzájem vykazovaly nižší identity, 95,1–98,9 %.

U jednoho z odlišných izolátů třetí lokality, 1900832-3/2, byly v nekódující oblasti identifikovány dvě delece ve srovnání s referenční sekvencí PNYDV DNA-M (NC\_023156.1). Delece tyminu v pozici 913 referenční sekvence a delece sekvence TGGGATCAAATAGTGTCATTT v pozici 924–944 referenční sekvence.

Zjištěné variability jednotlivých izolátů v rámci lokalit potvrdil i výsledný fylogenetický strom, obrázek 14. Jednu ze statisticky průkazných větví tvořily izoláty 1900813-1A, 1900815-1C, 1900832-1/2 společně s dánským izolátem DK HZ16-583 (MH000267.1). Další samostatnou skupinu tvořily izoláty 1900832-3/2, 1900813-3A, 1900832-1/3 a nizozemský izolát NL HZ16-189 (KY593288.1). Také zmiňované izoláty 1900813-2A, 1900815-3A, 1900836-2A, 1900836-1B se vyskytovaly v jedné z větví společně s dalšími evropskými izoláty Drohndorf-15 (NC\_023156.1), 110726 (KY810775.1), DK HZ16-572 (MH000239.1), DK HZ16-573 (MH000250.1) a DK HZ16-582 (MH000256.1).

Aminokyselinové sekvence ‚movement‘ proteinu většiny izolátů byly naprosto totožné, obrázek 14. Výjimkou se staly tři české izoláty, 1900813-1A, 1900815-1C a 1900832-1/2. Tyto izoláty byly odlišné všem ostatním (96,8–97,5% identita), ale navzájem vykazovaly 99,9% identitu. Stejnou identitu také sdílely s dánským izolátem DK HZ16-583 (MH000267.1). Tyto čtyři izoláty tvořily ve fylogenetickém stromu samostatnou statisticky průkaznou větev.





**Obrázek 14:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-M segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí ‚movement‘ proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sequencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

// : přerušení větve

#### 5.2.4 Genetická analýza DNA-N

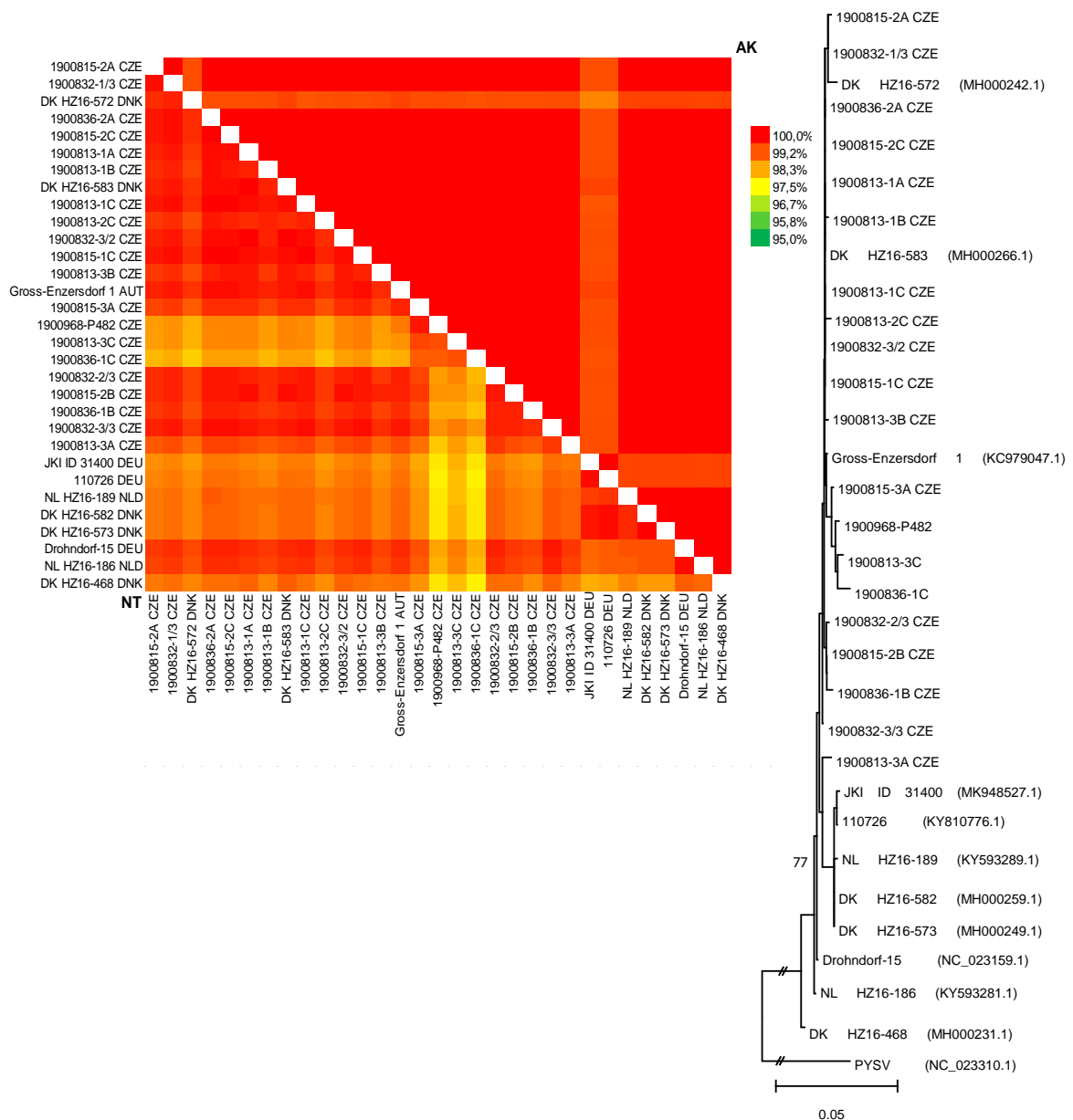
Většina izolátů z lokalit I, II, III a IV tvořily navzájem homogenní skupinu a vykazovaly k sobě velmi vysoké identity, 99,6–100 %, obrázek 15. Výjimkou byly dva vzorky, 1900813-3A a -3C, které se odlišovaly od všech ostatních izolátů ze stejné lokality i z lokalit dalších. Izolát 1900813-3A byl nejvíce podobný (99,5 %) německému izolátu Drohndorf-15 (NC\_023159.1). Naopak izolát 1900813-3C vykazoval nejvyšší identitu (99,2–99,3 %) s izoláty 1900815-3A, 1900836-1C a 1900968-P482.

U těchto čtyř izolátů (1900813-3C, 1900815-3A, 1900836-1C, 1900968-P482) byla identifikována delece sekvence TGGGATCAAATAGTGTTCATTT v pozici 929–949 referenční sekvence PNYDV DNA-N (NC\_023159.1). U vzorku 1900813-3C se vyskytovala i delece adeninu v pozici 918 referenční sekvence

Při srovnání českých izolátů s evropskými byla zjištěna největší podobnost (98,4–99,9 %) u 16 vzorků z 20 s dánským izolátem DK HZ16-583 (MH000266.1) a německým izolátem Drohndorf-15 (NC\_023159.1). Další evropské izoláty, JKI ID 31400 (MK948527.1), DK HZ16-582 (MH000259.1), DK HZ16-573 (MH000249.1), DK HZ16-468 (MH000231.1), 110726 (KY810776.1) a NL HZ16-189 (KY593289.1), se od českých odlišovaly výrazněji, vykazovaly s českými izoláty identitu 97,7–99,1 %.

Odlišnost izolátů 1900813-3C, 1900815-3A, 1900836-1C a 1900968-P482 od ostatních prokázala i fylogenetická analýza, kde se tyto čtyři izoláty vyvětvily do samostatné větve, obrázek 15. Samostatnou skupinu také vytvořily již zmiňované evropské izoláty DK HZ16-582 (MH000259.1), DK HZ16-573 (MH000249.1), NL HZ16-189 (KY593289.1), JKI ID 31400 (MK948527.1) a 110726 (KY810776.1).

Aminokyselinové sekvence NSP proteinu českých izolátů byly téměř totožné a vyskytovala se u nich pouze nízká variabilita, obrázek 15. České izoláty navzájem vykazovaly 99,9% až 100% identity. Ve fylogenetickém stromu vytvořily samostatnou statisticky průkaznou větev pouze německé izoláty JKI ID 31400 (MK948527.1) a 110726 (KY810776.1). Samostatně se také vyvětvil dánský izolát DK HZ16-572 (MH000242.1).



**Obrázek 15:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-N segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí NSP proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

// : přerušení větve

### 5.2.5 Genetická analýza DNA-R

U sekvencí DNA-R byla zaznamenána celkově nejnižší variabilita. Většina izolátů vykazovala navzájem 99,8–100% identitu, obrázek 16. Mírně odlišným byl pouze jeden český izolát, 1900813-3C, který sdílel s ostatními izoláty pouze 99,3–99,7% identitu. Při srovnání s evropskými izoláty se ukázalo, že německé izoláty Drohndorf-15 (NC\_023154.1) a JKI ID 31400 (MK948528.1) byly oproti ostatním izolátům také mírně odlišné, vykazovaly k ostatním izolátům 99,3–99,8% identitu.

V rámci fylogenetického stromu tvořil německý izolát JKI ID 31400 (MK948528.1) a český izolát 1900813-3C samostatnou větev. Zároveň se samostatně vyvětvil i izolát Drohndorf-15 (NC\_023154.1).

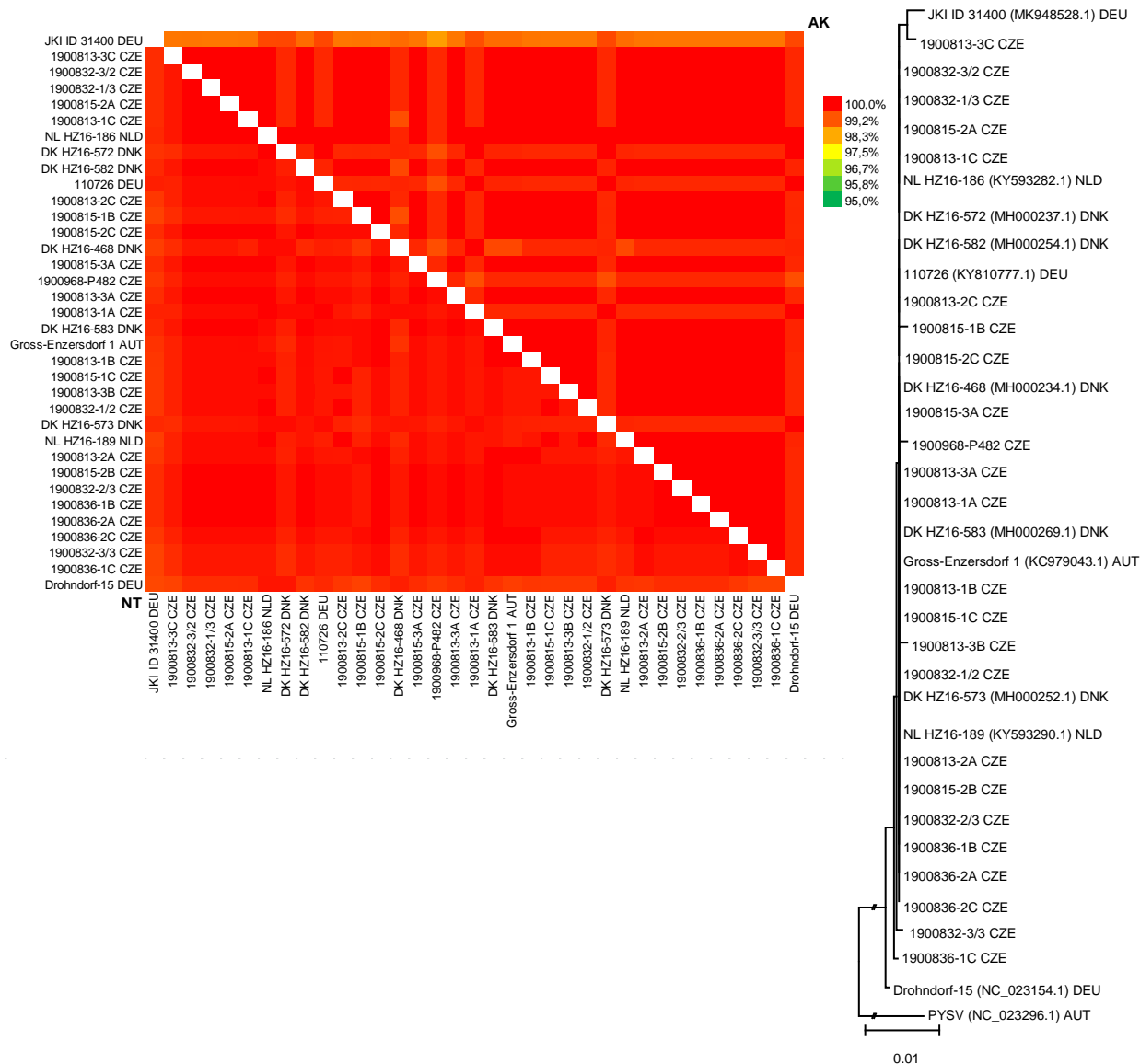
Aminokyselinové sekvence M-Rep proteinu byly opět navzájem totožné, obrázek 16. Z českých izolátů pouze izolát 1900968-P482 nevykazoval 100% identitu s žádným jiným izolátem, jeho identita k ostatním se pohybovala v rozmezí 98,5–99,6 %. Výrazněji se ale odlišoval německý izolát JKI ID 31400 (MK948528.1), který s ostatními izoláty sdílel pouze 98,4–99,3% identitu.

### 5.2.6 Genetická analýza DNA-S

U českých izolátů DNA-S byla zaznamenána vysoká homogenita, navzájem vykazovaly 97,8–100% identitu, obrázek 17. Izoláty z lokality II a IV byly navzájem téměř totožné, 99,6–100% identitu. K izolátům z lokality II a IV se také podobaly až na výjimky (99,5–100 %) izoláty z první (1900813-1B, -1C a -3C) a třetí lokality (1900832-1/3, -2/1, -3/2 a -3/3). Izolát 1900813-1A vykazoval nejvyšší identitu (99,8 %) s dánským izolátem DK HZ16-583 (MH000265.1). Další izoláty z lokality I, 1900813-2A, -2C a -3B, si byly velmi blízké a vykazovaly 99,8–100% identitu k dánskému izolátu DK HZ16-468 (MH000230.1), německému Drohndorf-15 (NC\_023155.1) a nizozemskému NL HZ16-189 (KY593291.1).

Sekvence plášťového proteinu českých izolátů byly na základě p-distance analýzy rozděleny do dvou homogenních skupin, obrázek 17. Jednu skupinu tvořily izoláty 1900813-2A,-2C, -3A, -3B, 1900832-1/2,-2/3 a 1900968-P482, které byly také shodné

s dánským izolátem DK HZ16-468 (MH000230.1), německým izolátem Drohndorf-15 (NC\_023155.1) a nizozemským izolátem NL HZ16-189 (KY593291.1).

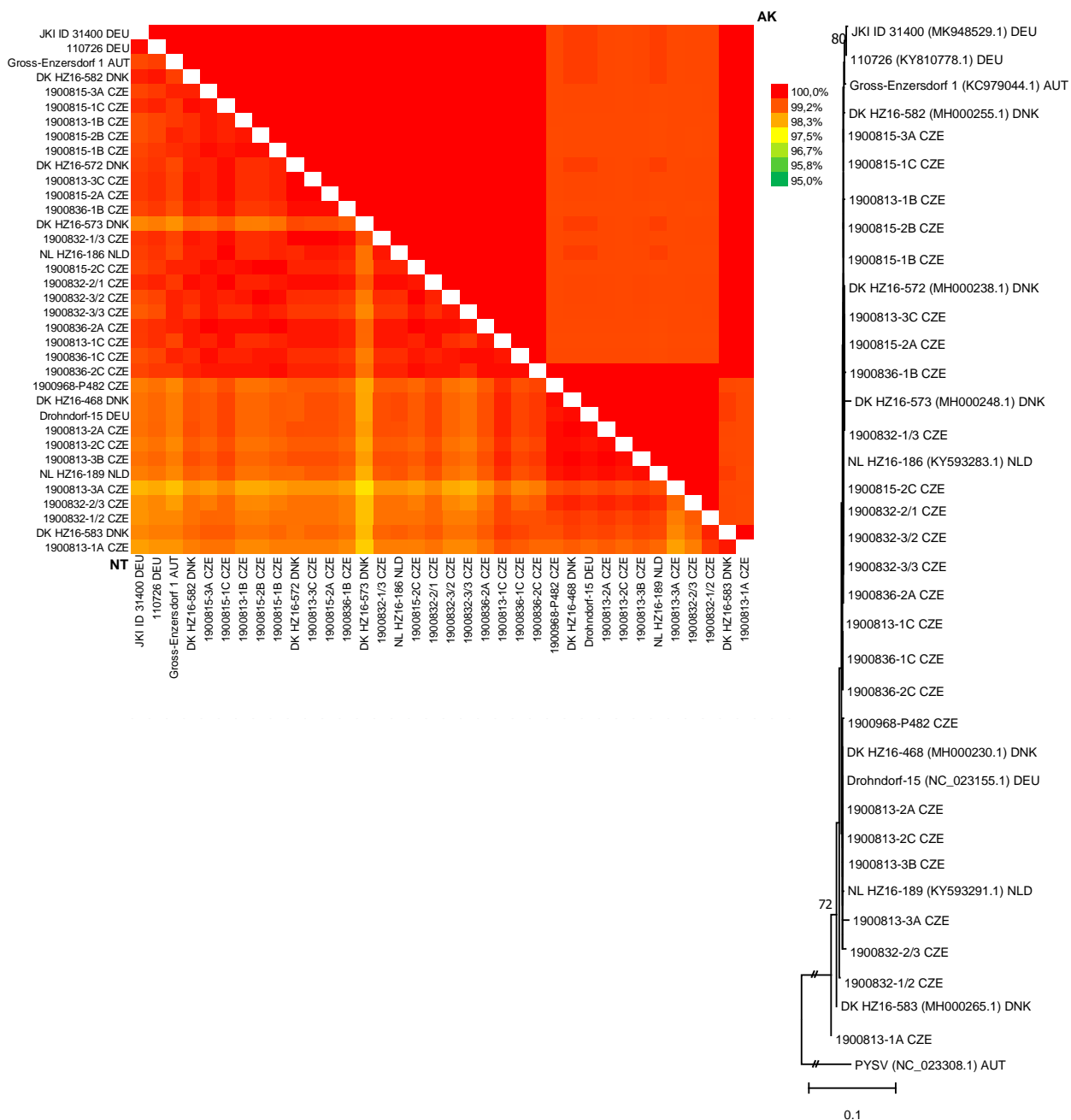


**Obrázek 16:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-R segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí M-Rep proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,01 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

// : přerušení větve



**Obrázek 17:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-S segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí plášťového proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,1 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

—// : přerušení větve

### 5.2.7 Genetická analýza DNA-U2

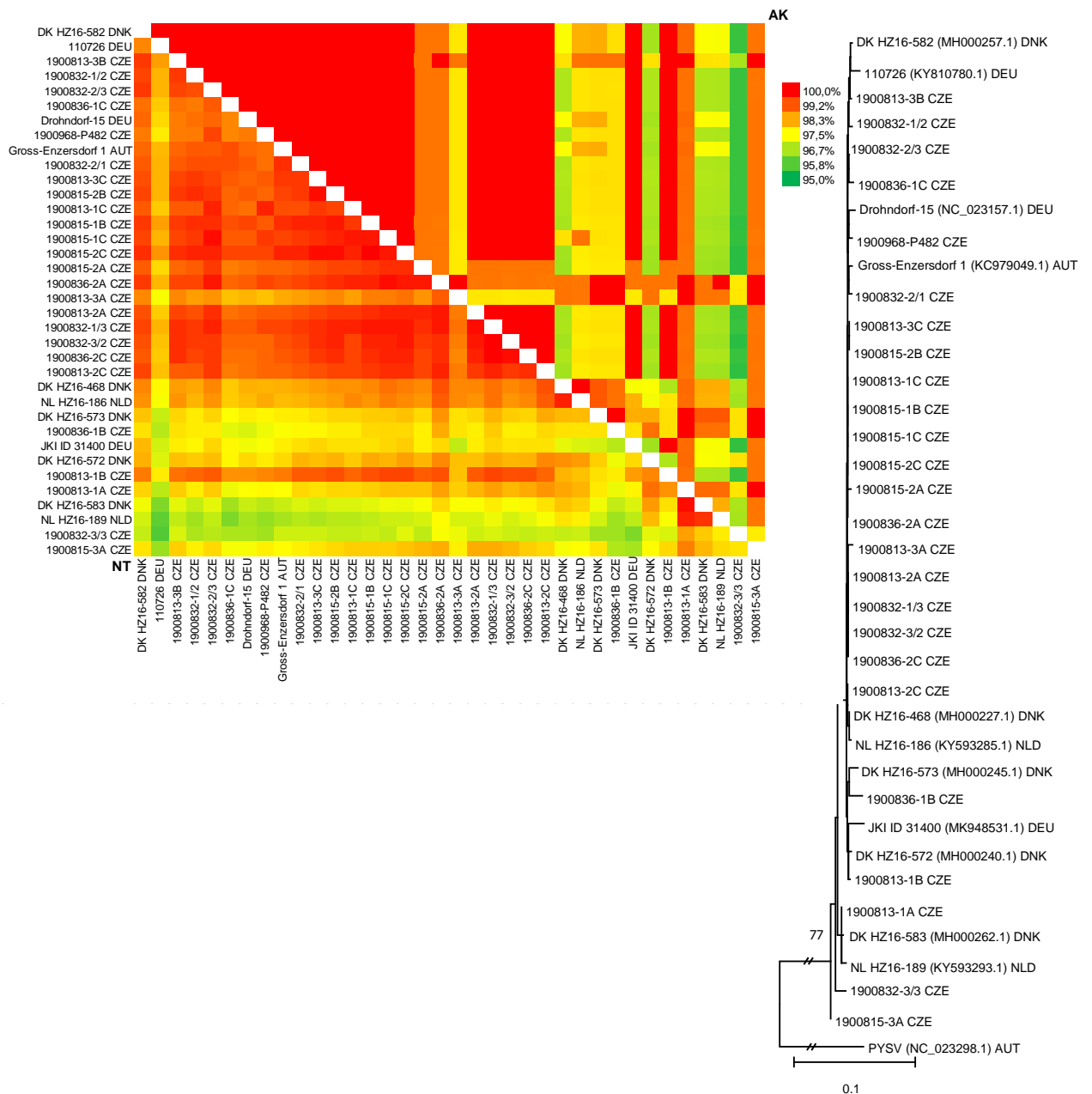
Většina sekvencí DNA-U2 ze všech lokalit vykazovala navzájem velmi blízké identity (98,9–100 %) a tvořila téměř nevariabilní skupinu, obrázek 18. Odlišnost od ostatních se ukázala u čtyř izolátů, 1900813-1A, 1900815-3A, 1900832-3/3 a 1900836-1B. Izolát 1900813-1A byl nejvíce podobný (99,9 % a 99,7 %) dánskému izolátu DK HZ16-583 (MH000262.1) a nizozemskému izolátu NL HZ16-189 (KY593293.1). S tímto českým izolátem vykazoval nejvyšší identitu (98,8 % a 98,4 %) i izolát 1900815-3A a 1900832-3/3. Izolát 1900836-1B byl nejvíce podobný (98,3 %) izolátu 1900836-2A.

Mírná odlišnost izolátu 1900836-1B může být dána výskytem delece sekvence TGT v pozici 247–249 referenční sekvence PNYDV DNA-U2 (NC\_023157.1). Dále byla identifikována inserce AT v pozici 754–755 u izolátu 1900836-1C.

Při srovnání českých izolátů s evropskými byla většina izolátů (22 z 25) nejvíce podobná (98,7–99,7 %) dánskému izolátu DK HZ16-582 (MH000257.1) a rakouskému izolátu Gross Enzersdorf 1 (KC979049.1).

V rámci fylogenetického stromu tvořily samostatnou statisticky průkaznou větev izoláty 1900813-1A, DK HZ16-583 (MH000262.1) a NL HZ16-189 (KY593293.1), ke kterým byl blízce příbuzný i izolát 1900832-3/3 a 1900815-3A, obrázek 18.

U U2 proteinu byla variabilita opět nižší, obrázek 18. Velká část izolátů byla sekvenčně shodná. Nejodlišnějším izolátem se stal izolát 1900832-3/3, u kterého se identity s ostatními izoláty pohybovaly v rozmezí 95,5–97,7 %. Vlastní skupinu také vytvořily izoláty 1900813-1A, -3B, 1900815-3A, 1900836-1B a -2A, které navzájem byly totožné, ale k ostatním českým izolátům odlišné (cca 98,8% identita). K izolátům 1900813-1A, -3B, 1900815-3A, 1900836-1B a -2A byl také totožný dánský izolát DK HZ16-573 (MH000245.1).



**Obrázek 18:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-U2 segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí U2 proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nt-sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,1 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

// : přerušení větve



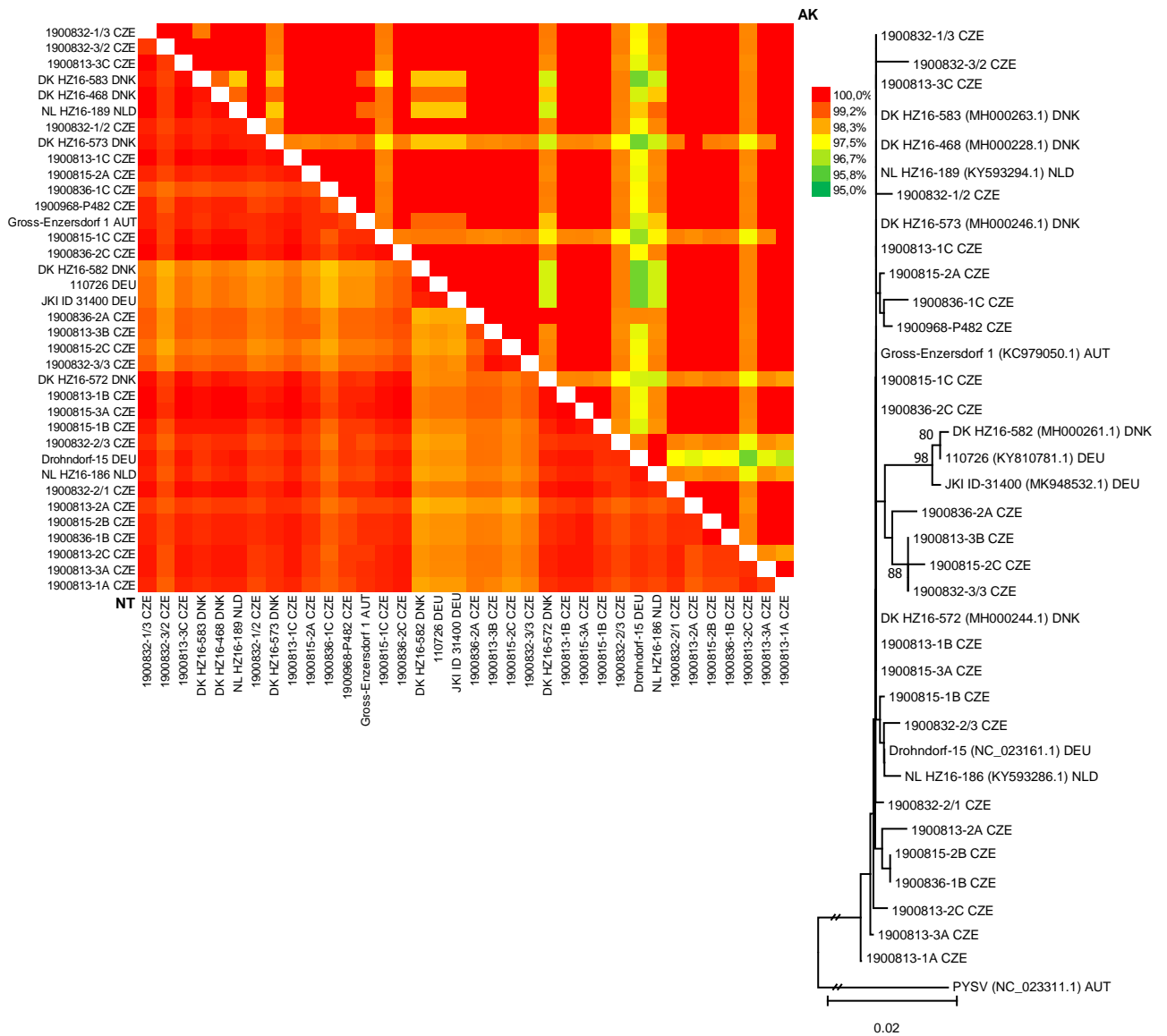
### 5.2.8 Genetická analýza DNA-U4

Izoláty DNA-U4 byly navzájem opět poměrně homogenní, vykazovaly 98–100% identitu, obrázek 19. V rámci lokality I se od ostatních izolátů odlišoval pouze izolát 1900813-3B a nejvyšší podobnost vykazoval (99,7 % a 99,9 %) s izoláty 1900815-2C a 1900832-3/3. Mezi českými izoláty se také vytvořila zcela homogenní skupina izolátů 1900813-1B, -1C, 3C, 1900815-3A, 1900832-1/3 a 1900836-2C. Při porovnání českých izolátů s evropskými izoláty byla převážná většina (23 z 25) nejvíce podobná (98,9–100 %) dánskému izolátu DK HZ16-468 (MH000228.1).

U českých izolátů byla identifikována jediná delece, která se vyskytovala u izolátu 1900836-1C. Jednalo se o deleci cytosinu v nekódující oblasti v pozici 344 referenční sekvence PNYDV DNA-U4 (NC\_023161.1).

Ve fylogenetickém stromu vznikly 3 statisticky průkazné skupiny, obrázek 19. Dvě z těchto skupin obsahovaly české izoláty. První větev obsahovala izoláty 1900815-2A, 1900836-1C a 1900968-P482. Druhá větev pak obsahovala izoláty 1900836-2A, 1900815-2C, 1900813-3B a 1900832-3/3.

Aminokyselinové sekvence U4 proteinu byly opět méně variabilní než nukleotidové a většina izolátů byla navzájem shodná, obrázek 19. Odlišoval se pouze český izolát 1900832-2/3, který byl ale totožný k nizozemskému izolátu NL HZ16-186 (KY593286.1). Nejvzdálenějším izolátem se stal izolát 1900813-2C, jehož U4 protein vykazoval s ostatními izoláty pouze 96,1–98,7% identitu. Ve fylogenetickém stromu se vyvětvil do samostatné skupiny český izolát 1900832-2/3 společně s nizozemským izolátem NL HZ16-186 (KY593286.1) a německým izolátem Drohndorf-15 (NC\_023161.1). Samostatnou větev také tvořil český izolát 1900813-2C.



**Obrázek 19:** Heatmapa identit nukleotidových sekvencí DNA-U4 segmentu (vlevo; NT) a odpovídajících aminokyselinových sekvencí U4 proteinu (vpravo; AK); a příslušný fylogenetický strom izolátů konstruovaný na základě nukleotidových sekvencí pomocí neighbor-joining analýzy.

Měřítko představuje 0,02 substitucí na pozici.

AUT: Rakousko, CZE: Česká republika, DEU: Německo, DNK: Dánsko, NLD: Nizozemsko

// : přerušení větve

### 5.2.9 Rekombinantní analýza

Na základě RDP4 rekombinantní analýzy bylo identifikováno 7 rekombinantních událostí v nekódujících oblastech podpořených 4–7 statistickými algoritmy (RDP, GENECONV, Bootscan, Maxchi, Chimaera, SiSscan a 3Seq), tabulka 9.

Analýzou bylo identifikováno 5 českých rekombinantních izolátů. Tři rekombinantní události proběhly mezi DNA-C a DNA-N. Jednalo se o rekombinanta DNA-C izolátu 1900813-1A, u něhož byly identifikovány jako potenciální rodičovské sekvence DNA-N (major) izolátu NL HZ16-189 (Acc. No. KY593289.1) a DNA-C (minor) izolátu 1900832-1/2. Druhým rekombinantem byla DNA-C izolátu 1900832-1/3, která vznikla potenciální rekombinací DNA-C (major) izolátu DK HZ16-468 (MH000229.1) a DNA-N (minor) izolátu 1900968-P482. Segment DNA-C izolátu 1900832-1/2 byl identifikován jako další rekombinantní molekula a jeho rodičovské sekvence byly DNA-C (major) izolátu JKI ID 3140 (MK948525.1) a DNA-N (minor) izolátu 1900968-P482.

Dvě rekombinantní události se týkaly segmentu DNA-M. V prvním případě se jednalo o rekombinanta DNA-M izolátu 1900832-3/2, jež vznikl rekombinací DNA-U4 (major) izolátu DK HZ16-582 (MH000261.1) a DNA-N (minor) izolátu 1900968-P482. Je pravděpodobné, že molekula DNA-N izolátu 1900968-P482 je také rekombinantní molekulou. Tato rekombinace byla jako jediná identifikována všemi použitými metodami. Druhá rekombinantní událost zahrnovala jako rekombinanta DNA-M izolátu 1900813-3C, jehož majoritní rodičovská sekvence je neznámá, ale jako minoritní byla identifikována molekula DNA-N izolátu DK HZ16-468 (MH000231.1).

Poslední dvě rekombinantní události zahrnovaly české izoláty jako jednoho z rodičovských sekvencí. V prvním případě byl detekován rekombinant DNA-M izolátu DK HZ16-468 (MH000232.1) a jako jeho rodičovské sekvence byly identifikovány DNA-M (major) izolátu NL HZ16-186 (KY593280.1) a DNA-U2 (minor) izolátu 1900813-3A. Poslední rekombinantní událost byla identifikována u DNA-U2 izolátu 110726 (KY810780.1), jehož rodičovské sekvence byly DNA-U2 (major) izolátu 1900832-3/3 DNA-U2 a DNA-M (minor) izolátu NL HZ16-186 (KY593280.1).

**Tabulka 9:** Výsledky rekombinanční analýzy.

Rekombinantní událost	Počátek místa rekombinace	Počátek místa rekombinace 99% CI	Konec místa rekombinace	Konec místa rekombinace 99% CI	Rekombinant	Majoritní sekvence	Minoritní sekvence
1	754	739–779	888	69–97	1900832-3/2-M	DK HZ16-582-U4	1900968-P482-N
2	178	148–187	817	697–874	19000813-1A-C	NL HZ16-189-N	1900832-1/2-C
3	neurčeno	909–29	96	87–04	1900813-3C-M	neznámý	DK HZ16-468-N
4	839	745–859	10	48–142	1900832-1/3-C	DK HZ16-468-C	1900968-P482-N
5	745	692–758	10	872–114	1900832-1/2-C	JKI ID 3140-C	1900968-P482-N
6	681	663–696	neurčeno	770–178	DK HZ16-468-M	NL HZ16-186-M	1900813-3A-U2
7	675	657–691	neurčeno	764–191	110726-U2	1900832-3/3-U2	NL HZ16-186-M

Rekombinantní událost	RDP	GENECONV	Bootscan	Maxchi	Chimaera	SiScan	3Seq
1	$1,898 \cdot 10^{-6}$	$4,063 \cdot 10^{-5}$	$2,223 \cdot 10^{-6}$	$7,724 \cdot 10^{-4}$	$1,720 \cdot 10^{-4}$	$1,517 \cdot 10^{-4}$	$1,314 \cdot 10^{-2}$
2	-	-	$3,530 \cdot 10^{-3}$	$2,094 \cdot 10^{-3}$	$1,824 \cdot 10^{-2}$	$2,946 \cdot 10^{-54}$	$2,448 \cdot 10^{-7}$
3	$1,328 \cdot 10^{-7}$	$3,387 \cdot 10^{-18}$	$5,649 \cdot 10^{-6}$	$7,852 \cdot 10^{-6}$	$1,498 \cdot 10^{-3}$	$2,067 \cdot 10^{-5}$	-
4	$1,155 \cdot 10^{-13}$	$1,992 \cdot 10^{-8}$	$9,745 \cdot 10^{-14}$	$7,382 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3,770 \cdot 10^{-8}$
5	-	$8,288 \cdot 10^{-10}$	$1,349 \cdot 10^{-12}$	$5,388 \cdot 10^{-3}$	$4,115 \cdot 10^{-2}$	$1,254 \cdot 10^{-2}$	$1,021 \cdot 10^{-6}$
6	-	$5,102 \cdot 10^{-11}$	$4,801 \cdot 10^{-10}$	-	-	$1,801 \cdot 10^{-4}$	$2,107 \cdot 10^{-4}$
7	$7,755 \cdot 10^{-10}$	$1,274 \cdot 10^{-9}$	$1,432 \cdot 10^{-9}$	$9,730 \cdot 10^{-1}$	-	$1,140 \cdot 10^{-5}$	$4,614 \cdot 10^{-5}$

CI: interval spolehlivosti (,confidence interval')

## 6 Diskuze

Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) je nově popsáným virem napadající luštěniny, např. hrách setý (*Pisum sativum* L.), čočku jedlou (*Lens culinaris* Medik.), bob obecný (*Vicia faba* L.) nebo vikev setou (*Vicia sativa* L.) (Grigoras *et al.*, 2010; Gaafar *et al.*, 2016). K jeho prvotní detekci došlo v roce 2009 v Německu a jeho výskyt byl v dalších letech hlášen i v Rakousku, Nizozemsku a Dánsku (Gaafar *et al.*, 2016; Gaafar *et al.*, 2017; Gaafar *et al.*, 2018; Grigoras *et al.*, 2010). V roce 2019 byl PNYDV nově detekován na hrachu setém (*Pisum sativum* L.) i v České republice a to na pěti lokalitách (Jaroměřice nad Rokytnou, Čáslav, Uherský Ostroh, Chrlice a Uhříněves).

Genetická variabilita českých izolátů PNYDV byla nízká a jednalo se o velmi homogenní skupinu. Z mé fylogenetické analýzy také nevyplývala žádná geografická ani druhová specifita. Tyto výsledky korelují s výsledky Grigorase *et al.* (2014), který nezjistil žádnou významnější variabilitu v rámci genomů nanovirů. Z tohoto jsem usoudila, že je virus pravděpodobně evolučně mladý a zatím nedošlo k výraznějšímu genetickému rozrůznění. Je ale možné, že se PNYDV vyskytuje v Evropě delší dobu, než se domníváme, pouze nedošlo k jeho detekci v rámci směsných infekcí. Typicky se totiž PNYDV vyskytuje společně s pea enation mosaic virus (PEMV), nebo se zástupci rodu *Polerovirus* a zástupci čeledi *Potyviridae* (Saucke *et al.*, 2018). Proto je možné, že některé pozorované symptomy mohly být chybně přiřazovány jinému viru bobovitých rostlin (např. PEMV), nebo že viry navzájem v rámci koinfekce interagují a moduluji průběh infekce, ať už negativně či pozitivně, a tedy došlo k výskytu jeho ničivých projevů až v této době. U rostlinných virů byly popsány jak synergické, tak antagonistické interakce, ale také byly zaznamenány interakce pomocného viru a viru závislého (Syller, 2012). Synergické interakce mezi dvěma rostlinnými viry vedoucí ke zvýraznění symptomů infekce, obejití rezistence hostitele a rychlejšímu odumření hostitelské rostliny byly popsány například u dvojice virů tomato chlorosis virus (ToCV) a tomato spotted wilt virus (TSWV) (García-Cano *et al.*, 2006), pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) a pepper golden mosaic virus (PepGMV) (Rentería-Canett *et al.*, 2011), nebo sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) a sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) (Untiveros *et al.*, 2007).

V rámci práce byly studovány jednotlivé genomové segmenty, u některých izolátů se ale opakovaně nepodařilo amplifikovat genomový segment DNA-C a DNA-M.

Je možné, že se amplifikace nezdařila z důvodu výraznější variability v místě nasedání primerů. U nanovirů byl potvrzen výskyt vnitrodruhové i mezidruhové rekombinace (Grigoras *et al.*, 2014), je tedy možné že se mohlo jednat o rekombinantní molekuly, u kterých místo nasedání neodpovídalo použité kombinaci primerů.

Mutace zaznamenané u českých izolátů PNYDV se nejčastěji vyskytovaly v nekódující oblasti a většinou nezasahovaly do žádné funkčně důležité oblasti, což odpovídá i výsledkům práce Grigoras *et al.* (2014). V rámci kmenové smyčky byla identifikována mutace v první pozici, která ale nebyla unikátní. Stejná mutace se vyskytovala i u německého izolátu JKI ID 31400 (Acc. No. MK948525.1; MK948526.1; MK948527.1; MK948531.1). Mutace v kódující oblasti se vyskytovaly u českých i zahraničních izolátů, ale byly spíše výjimečné, většinou byly zaznamenány synonymní mutace, které se neprojeví v sekvenci proteinu. Toto pozorování odpovídá dosavadním poznatkům o genetické variabilitě kódujících oblastí i dalších zástupců nanovirů, u nichž jsou mutace v kódujících oblastech ojedinělé (Grigoras *et al.*, 2014).

U nanovirů faba bean necrotic yellows virus (FBNYV), pea yellow stunt virus (PYSV), faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) a black medic leaf roll virus (BMLRV) byly identifikovány Grigorasem *et al.* (2014) nejen jednonukleotidové záměny, ale také rozsáhlejší indely. V naší práci byly poprvé zaznamenány indely i u izolátů PNYDV. V rámci rekombinantní analýzy vyplynulo, že tyto indely vznikají v důsledku rekombinantních událostí. U některých rostlin byly zaznamenány směsné infekce více variabilních izolátů PNYDV, což může napomáhat vzniku vnitrodruhových rekombinací. U nanovirů byla zaznamenána ale i rekombinace mezidruhová (Grigoras *et al.*, 2014), je tedy pravděpodobné, že k ní může docházet i u PNYDV, který se může vyskytovat ve směsných infekcích s dalšími rostlinnými viry (např. PEMV, viry rodu *Polerovirus* a čeledi *Potyviriidae*) (Saucke *et al.*, 2018).

V práci Grigorase *et al.* (2014) byla zaznamenána u nanovirů nejčastěji rekombinace u segmentů DNA-C, DNA-U2 a DNA-U4, nejméně pak rekombinoval segment DNA-S. V mém případě jsem zaznamenala stejně jako Grigoras *et al.* (2014) nejvíce rekombinantních molekul u segmentů DNA-C (3 rekombinantní události), ale také jsem identifikovala tři rekombinantní události u molekuly DNA-M. Grigoras *et al.* (2014) také popsal rekombinaci mezi molekulou DNA-U2 FBYLV a DNA-M PYSV, která vyústila ve vznik molekuly DNA-U2 PYSV. Rekombinace mezi DNA-U2 a DNA-M se vyskytovala i v mých výstupech, ale jednalo se pouze o vnitrodruhovou rekombinaci,

konkrétně byly identifikovány dvě rekombinantní události, kdy v jednom případě byla molekula DNA-M majoritní sekvencí a molekula DNA-U2 minoritní sekvencí a v druhém případě byla situace opačná. Na rozdíl od Grigorase *et al.* (2014) jsem nezaznamenala žádnou mezidruhovou rekombinaci.

PNYDV je přenášen pomocí mšic napadající bobovité rostliny, konkrétně se jedná o kyjatku hrachovou (*Acyrtosiphon pisum*), mšici makovou (*Aphis fabae*) a mšici vojtěškovou (*Aphis craccivora*) (King *et al.*, 2012). Výskyt kyjatky hrachové (*Acyrtosiphon pisum*) v České republice v posledních letech stoupá. Od roku 2016 byla opětovně zaznamenána nadprůměrná letová aktivita této mšice. V roce 2019 byla kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum*) detekována na 38 monitorovacích lokalitách ÚKZUZu s hrachem setým (*Pisum sativum* L.), z toho na 11 lokalitách se jednalo o škodlivý výskyt, tj. výskyt 3 a více mšic na rostlinu. Maximální výskyt byl zaznamenán v Lomu u Tachova, kde bylo v průměru 16 mšic na rostlinu (Rychlý *et al.*, 2020; Šafář *et al.*, 2019; ÚKZUZ, Rostlinolékařský portál, 2021).

Nejen že se kyjatka hrachová úspěšně šíří po území České republiky, může ale také docházet k přenosům nakažených mšic mezi jednotlivými státy Evropy. Dle hypotézy ‚hopand fly‘ jsou mšice schopné migrovat na dlouhé vzdálenosti za pomoci silných větrů, kdy mohou být unášeny i několik stovek kilometrů daleko (Ghosh *et al.*, 2019). Tato hypotéza by mohla vysvětlit rychlé rozšíření PNYDV v rámci Evropy. Vítr totiž pravidelně proudí směrem od Dánska, přes Německo a Českou republikou, ale také směrem zpět.

Kyjatka hrachová napadá nejen bob obecný a hrách setý, ale také sóju luštinatou, jetel luční, tolici vojtěšku a různé druhy lupiny (ÚKZUZ, Rostlinolékařský portál, 2021). Všechny hostitelské rostliny kyjatky hrachové spadají do čeledi bobovitých (*Fabaceae*), hypoteticky je tedy možné, že okruh hostitelů PNYDV může být daleko širší. Důležitým rezervoárem mohou být i plané bobovité rostliny rostoucí kolem polí, u kterých ale může infekce probíhat latentně a nemusí tedy docházet k viditelným, destruktivním účinkům, které jsou pozorovány u hrachu setého a bobu obecného.

Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) je stále velmi málo popsán virus, který ale způsobuje závažná poškození na svých hostitelích, která mohou končit až samotným odumření rostliny. Infekce tímto virem má tedy i fatální důsledky pro jejich pěstitele. Proto je potřeba dále prohlubovat znalosti především o šíření viru, jeho hostitelském okruhu zejména rezervoárových rostlinách, okruhu vektorů, ale také o genetické variabilitě,

tak aby se v budoucnu dalo šíření tohoto viru efektivně bránit a jeho výskyt, co nejvíce eliminovat.



## 7 Závěr

V rámci této diplomové práce byl analyzován soubor 24 vzorků hrachu setého (*Pisum sativum* L.) a 1 vzorek hrachu setého peluška (*Pisum sativum* var. *arvense* (L.) Poir.) z pěti lokalit (Jaroměřice nad Rokytou, Čáslav, Uherský Ostroh, Chrlice a Uhříněves) v České republice. Infekce PNYDV byla potvrzena u všech získaných symptomatických vzorků. U jednotlivých izolátů viru byly amplifikovány genomové segmenty DNA-C, -M, -N, -R, -S, -U2 a -U4 a byly získány jejich odpovídající parciální sekvence o délce 861–939 bp.

U všech nukleotidových sekvencí českých izolátů PNYDV byly identifikovány charakteristické motivy, jako jsou: kmenová smyčka, replikační počátek, TATA box a polyadenylační signální sekvence. Jejich sekvence i pozice odpovídala druhovému popisu, odchylky byly identifikovány pouze u sekvencí s indely. U 15 sekvencí českých PNYDV izolátů byla detekována substituce C→G na první pozici v rámci kmenových smyček genomových segmentů DNA-C, -M, -N a -U2. U izolátu 1900836-1B byla také detekována substituce A→T v pozici jedna v polyadenylační signální sekvenci. Mutace se převážně vyskytovaly v nekódující oblasti, v kódujících oblastech byly mutace pouze výjimkou, nebo se zde vyskytovaly mutace synonymní.

Nukleotidové i aminokyselinové sekvence jednotlivých genomových segmentů českých izolátů tvořily ve všech případech silně homogenní skupiny s velmi nízkou variabilitou. Při srovnání českých a evropských PNYDV izolátů byla zaznamenána nejvyšší variabilita u nukleotidových sekvencí DNA-M, kdy izoláty vykazovaly navzájem 94,8–100% identitu. Naopak nejnižší variabilita byla detekována u nukleotidových sekvencí DNA-R (99,3–100% identita).

Celkově bylo detekováno 7 rekombinantních událostí, kdy v pěti případech byl rekombinantní segment detekován u českého izolátu a ve dvou případech u zahraničních izolátů. Jedna rekombinantní událost byla zaznamenána mezi genomovými segmenty DNA-U4 a DNA-N, jedna také mezi DNA-N a DNA-C, pak dvě události mezi DNA-C a DNA-N, jedna událost mezi DNA-M a DNA-U2 a jedna událost mezi DNA-U2 a DNA-M. U poslední rekombinace byla určena pouze minoritní rodičovská sekvence a jednalo se o genomový segment DNA-N.

Pea necrotic yellow dwarf virus (PNYDV) je novým stále ještě nepříliš popsáným virem, který se v posledních letech výrazně rozšířil již v pěti státech Evropy (Německo, Rakousko, Dánsko, Nizozemsko a Česká republika) a je pravděpodobné, že budeme jeho výskyt postupně detekovat i v dalších zemích. PNYDV je závažným patogenem luštěnin, u nichž infekce způsobuje velmi vážná poškození a vede až k odumírání hostitelů. Je tedy nutné zaměřit se na důkladné pochopení biologických vlastností tohoto viru, rozšířit znalosti o jeho genetické variabilitě, okruhu hostitelů, okruhu vektorů a identifikovat potenciální rezervoáry, kterými by mohly být i např. plané bobovité rostliny. Je důležité se zaměřit na zabránění šíření PNYDV dále po světě a najít správný postup, co nejúčinnější ochrany pěstovaných luštěnin.

## 8 Literatura

- Abraham A. D., Bencharki B., Torok V., Katul L., Varrelmann M., Vetten H. J. (2010): Two distinct nanovirus species infecting faba bean in Morocco. *Archives of Virology* 155: 37–46.
- Abraham A. D., Varrelmann M., Vetten, H. J. (2012): Three distinct nanoviruses, one of which represents a new species, infect faba bean in Ethiopia. *Plant Disease Journal* 96: 1045–1053.
- Abouzid A. M., Frischmuth T., Jeske H. (1988): A putative replicative form of the abutilon mosaic-virus (gemini group) in a chromatin-like structure. *Molecular and General Genetics* 212: 252–258.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Amin I., Qazi J., Mansoor S., Ilyas M., Briddon R. W. (2008): Molecular characterisation of banana bunchy top virus (BBTV) from Pakistan. *Virus Genes* 36: 191–198.
- Aronson M. N., Meyer A. D., Györgyey J., Katul L., Vetten H. J., Gronenborn B., Timchenko T. (2000): Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *Journal of Virology* 74 (7): 2967–2972.
- Ashby M. K., Warry A., Bejarano E. R., Khashoggi A., Burrell M., Lichtenstein C. P. (1997): Analysis of multiple copies of geminiviral DNA in the genome of four closely related nicotiana species suggest a unique integration event. *Plant Molecular Biology* 35: 313–321.
- Bai C., Sen P., Hofmann K. Ma L., Goebel M., Harper J. W., Elledge S. J. (1996): SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell Press* 86 (2): 263–274.
- Beetham P. R., Harding R. M., Dale J. L. (1999). Banana bunchy top virus DNA-2 to 6 are monocistronic. *Archives of Virology* 144: 89–105.
- Belyi V. A., Levine A. J., Skalka A. M. (2010): Sequences from ancestral single-stranded DNA viruses in vertebrate genomes: The parvoviridae and circoviridae are more than 40 to 50 million years old. *Journal of Virology* 84: 12458–12462.
- Briddon R. W., Martin D. P., Roumagnac P., Navas-Castillo J., Fiallo-Olivé E., Moriones E., Lett J. M., Zerbini F. M., Varsani A. (2018): *Alphasatellitidae*: a new family

- with two subfamilies for the classification of geminivirus- and nanovirus-associated alphasatellites. *Archives of Virology* 163: 2587–2600.
- Bridson R. W., Ghabrial S., Lin N. S., Palukaitis P., Scholthof K. B. G., Vetten H. J. (2012): Satellites and other virus-dependent nucleic acids. In: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. C., Lefkowitz E. J. (eds.): *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1211–1219, Elsevier/Academic Press, London.
- Buchan J. R., Parker, R. (2009): Review eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular Cell* 36: 932–941.
- Burns T. M., Harding R. M., Dale J. L. (1995): The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *Journal of General Virology* 76: 1471–1482.
- Cockbain A. J., Costa C. L. (1973): Comparative transmission of bean leaf roll and pea enation mosaic viruses by aphids. *Annals of Applied Biology* 73(2): 167–176.
- Felsenstein J. (1974): The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78: 737–756.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Franz A., Makkouk K. M., Vetten H. J. (1997): Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopathologia Mediterranea* 36: 94–103.
- Fryč D., Rychlý S. (2016): Mšice. Malý atlas do ruky 3. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Opava.
- Gaafar Y., Grausgruber-Gröger S., Ziebell H. (2016): *Vicia faba*, *V. sativa* and *Lens culinaris* as new hosts for *Pea necrotic yellow dwarf virus* in Germany and Austria. *New Disease Reports* 34: 28.
- Gaafar Y., Timchenko T., Ziebell H. (2017): First report of *Pea necrotic yellow dwarf virus* in The Netherlands. *New Disease Reports* 35: 23.
- Gaafar Y., Cordsen Nielsen G., Ziebell H. (2018): Molecular characterisation of the first occurrence of *Pea necrotic yellow dwarf virus* in Denmark. *New Disease Reports* 37: 16.

- García-Cano E., Resende R. O., Fernández-Muñoz R., Moriones E. (2006): Synergistic Interaction Between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus Results in Breakdown of Resistance in Tomato. *Phytopathology* 96 (11): 1263–1269.
- Ghosh A., Das A., Vijayanandraj S., Mandal B. (2015): Cardamom bushy dwarf virus infection in large cardamom alters plant selection preference, life stages, and fecundity of aphid vector, *Micromyzus kalimpongensis* (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 45: 178–184.
- Ghosh S., Roy A., Chatterjee A., Sikdar S. R. (2019): Effect of regional wind circulation and meteorological factors on long-range migration of mustard aphids over indo-gangetic plain. *Scientific Reports* 9: 5626.
- Gibbs M. J., Armstrong J. S., Gibbs A. J. (2000): Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573–582.
- Grigoras I., Ginzo A. I. D. C., Martin D. P., Varsani A., Romero J., Mammadov A. C., Huseynova I. M., Aliyev J. A., Kheyr-Pour A., Huss H., Ziebell H., Timchenko T., Vetten H. J., Gronenborn B. (2014): Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Journal of General Virology* 95: 1178–1191.
- Grigoras I., Gronenborn B., Vetten H. J. (2010): First Report of a Nanovirus Disease of Pea in Germany. *Plant Disease* 94(5): 642.
- Grigoras I., Timchenko T., Gronenborn B. (2008): Transcripts encoding the nanovirus master replication initiator proteins are terminally redundant. *Journal of General Virology* 89: 583–593.
- Grigoras I., Vetten H.-J., Commandeur U., Ziebell H., Gronenborn B., Timchenko T. (2018): Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission. *Journal of Virology* 522: 281–291.
- Gronenborn B. (2004): Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Veterinary Microbiology* 98(2):103–109.
- Gronenborn B., Grigoras I., Vetten H. J. (2011): Nanovirus. In: Tidona C., Darai G. (eds.): *The Springer Index of Viruses*, pp. 959-68, Springer, New York.
- Halbert S. E., Baker C. A. (2015): Banana bunchy top virus and its vector *Pentalonia nigronervosa* (Hemiptera: Aphididae). *Patholog Circular* 47: 8.

- Hanley-Bowdoin L., Bejarano E., Robertson D., Mansoor S. (2013): Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology* 11: 777–788.
- Hastings P. J., Lupski J. R., Rosenberg S. M., Ira G. (2009): Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics* 10: 551–564.
- Herrera-Valencia V. A., Dugdale B., Harding R. M., Dale J. L. (2006): An iterated sequence in the genome of Banana bunchy top virus is essential for efficient replication. *Journal of General Virology* 87: 3409–3412.
- Hassan-Sheikhi P., Heydarnejad J., Massumi H., Kraberger S., Varsani A. (2020): Novel nanovirus and associated alphasatellites identified in milk vetch plants with chlorotic dwarf disease in Iran. *Virus Research* 276: 197830.
- Heydarnejad J., Kamali M., Massumi H., Kvarnheden A., Male M. F., Kraberger S., *et al.* (2017): Identification of a nanovirus-alphasatellite complex in *Sophora alopecuroides*. *Virus Research* 235: 24–32.
- Hogenhout S. A., Ammar El-D., Whitfield A. E., Redinbaugh M. G. (2008): Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46: 327–359.
- Hu J.-M., Yeh H.-H. (2011): Babuvirus. In: Tidona C., Darai G. (eds.): *The Springer Index of Viruses*, pp. 953-958, Springer, New York.
- Hyder M. Z., Shah S. H., Hameed S., Naqvi S. M. (2011): Evidence of recombination in the Banana bunchy top virus genome. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1293–1300.
- Chu P. W., Helms K. (1988): Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNAs associated with subterranean clover stunt disease. *Virology* 167: 38–49.
- Jeske H., Lutgemeier M., Preiss W. (2001): DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of abutilon mosaic virus. *The EMBO Journal* 20: 6158–6167.
- Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences* 8 (3): 275–282.
- Katul L., Timchenko T., Gronenborn B., Vetten H. J. (1998): Ten distinct circular ssDNA components, four of which encode putative replication-associated proteins,

- are associated with the faba bean necrotic yellows virus genome. *Journal of General Virology* 79: 3101–3109.
- King A., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (eds.) (2012): *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Amsterdam.
- Krapp S., Greiner E., Amin B., Sonnewald U., Krenz B. (2017): The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus. *Virus Research* 227: 6–14.
- Krek W. (1998): Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 36–42.
- Krenz B., Neugart F., Kleinow T., Jeske H. (2011): Self-interaction of Abutilon mosaic virus replication initiator protein (Rep) in plant cell nuclei. *Virus research* 161 (2): 194–197.
- Krenz B., Schießl I., Greiner E., Krapp S. (2017): Analyses of pea necrotic yellow dwarf virus-encoded proteins. *Virus Genes* 53: 454–463.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Lal A., Kil E.-J., Byun H.-S., Zarghami D. S., Kim J.-K., Lee S. (2018): First report of milk vetch dwarf virus associated with dwarfism in papaya in Korea. *Plant Disease* 102: 2666.
- Lal A., Kil E.-J., Thuy V. T. B., Fadhila C., Ho P. T., Byun H.-S., et al. (2020a): Milk vetch dwarf virus infection in the Solanaceae and Caricaceae families in Southeast Asia. *Plant Pathology* 69: 1026–1033.
- Lal A., Vo T. T. B., Sanjaya I. G. N. P. W., Ho P. T., Kim J. K., Kil E. J., Lee S. (2020b): Nanovirus Disease Complexes: An Emerging Threat in the Modern Era. *Frontiers in Plant Science* 11: 558403.
- Lam H. M., Ratmann O., Boni M. F. (2018): Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular biology and evolution* 35: 247–251.
- Lageix S., Catrice O., Deragon J. M., Gronenborn B., Pélissier T., Ramírez B. C. (2007): The Nanovirus-Encoded Clink Protein Affects Plant Cell Cycle Regulation through

- Interaction with the Retinoblastoma-Related Protein. *Journal of Virology* 81 (8): 4177–4185.
- Laufs J., Jupin I., David C., Schumacher S., Heyraud-Nitschke F., Gronenborn B. (1995): Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77: 765–773.
- Lefevre P., Harkins G. W., Lett J.-M., Briddon R. W., Leitch A. R., Chase M. W., Moury B., Martin D. P. (2011): Evolutionary time-scale of Begomoviruses: Evidence from integrated sequences in *Nicotiana* genome. *PLoS ONE* 6: e19193.
- Lefevre P., Lett J. M., Varsani A., Martin D. P. (2009): Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83: 2697–2707.
- Magee C. J. P. (1927): Investigation on the bunchy top disease of the banana. Council for Scientific and Industrial Research, Melbourne.
- Makkouk K. M., Kumari S. G. (2009): Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphidborne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa. *Virus Research* 141: 209–218.
- Mandal B., Mandal S., Pun K. B., Varma, A. (2004): First report of the association of a nanovirus with fourkey disease of large cardamom in India. *Plant Disease Journal* 88: 428–428.
- Martin D., Rybicki E. (2000): RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16: 562–563.
- Martin D. P., Biagini P., Lefevre P., Golden M., Roumagnac P., Varsani, A. (2011a): Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 3: 1699–1738.
- Martin D. P., Lefevre P., Varsani A., Hoareau M., Semegni J. Y., Dijoux B., Vincent C., Lett J. M. (2011b): Complex recombination patterns arising during geminivirus coinfections both preserve and demarcate biologically important intra-genome interaction networks. *PLoS Pathogens* 7 (9): e10002203.
- Martin D. P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. (2015): RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution* 1 (1): vev003.
- Martin D. P., Posada D., Crandall K. A., Williamson C. (2005): A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses* 21: 98–102.



- Martin G., Otto S. P., Lenormand T. (2006): Selection for recombination in structured populations. *Genetics* 172: 593–609.
- Maynard Smith J. (1992): Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34: 126–129.
- Mayo M. A. (2002): Virus taxonomy - Houston. *Archives of Virology* 147(5): 1071–1076.
- Murad L., Bielawski J. P., Matyasek R., Kovarik A., Nichols R. A., Leitch A. R., Lichtenstein C. P. (2004): The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in nicotiana. *Heredity* 92: 352–358.
- Owor B.E., Martin D. P., Shepherd D. N., Edema R., Monjane A. L., Rybicki E. P., Thomson J. A., Varsani A. (2007): Genetic analysis of maize streak virus isolates from uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology* 88: 3154–3165.
- Padidam M., Sawyer S., Fauquet C. M. (1999): Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265: 218–225.
- Patton E. E., Willems A. R., Tyers M. (1998): Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends in Genetics* 14: 236–243.
- Pérez-Sancho J., Vanneste S., Lee E., McFarlane H. E., Esteban Del Valle A., Valpuesta V., Friml J., Botella M. A., Rosado A. (2015): The Arabidopsis synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses. *Plant Physiology* 168 (1): 132–143.
- Pilartz M., Jeske H. (1992): Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology* 189: 800–802.
- Pilartz M., Jeske H. (2003): Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *Journal of Virology* 77: 10808–10818.
- Posada D., Crandall K. A. (2001): Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13757–13762.
- Pringle C. R. (1998): Virus taxonomy - San Diego 1998. *Archives of Virology* 143(7): 1449–1459.
- Rentería-Canett I., Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano R., Rivera-Bustamante R. F. (2011): Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal* 8: 104.

- Rychlý S. (2020): Prognóza výskytu mšic na jaře 2020. In: Agromanual.cz (online) (cit. 2. 2. 2021). Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/prognoza-vyskytu-msic-na-jare-2020>.
- Rychlý S., Fryč D., Škulavíková O. (2020): Monitorování letu mšic v České republice v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. Ústřední kontrolní zkušební ústav zemědělský, Laboratoř diagnostiky škodlivých organismů rostlin Opava, Opava.
- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Saucke H., Uteau D., Brinkmann K., Ziebell H. (2018): Symptomology and yield impact of *pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV) in faba bean (*Vicia faba* L. *minor*). *European Journal of Plant Pathology* 153: 1299–1315.
- Saunders K., Stanley J. (1999): A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264: 142–152.
- Sicard A., Michalakis Y., Gutiérrez S., Blanc S. (2016): The strange lifestyle of multipartite viruses. *PLoS Pathogens* 12 (11): e1005819.
- Sicard A., Pirolles E., Gallet R., Vernerey M.-S., Yvon M., Urbino C., *et al.* (2019): A multicellular way of life for a multipartite virus. *eLife* 8: e43599.
- Sicard A., Yvon M., Timchenko T., Gronenborn B., Michalakis Y., Gutierrez S., Blanc S. (2013): Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nature Communications* 4: 2248.
- Sicard A., Zeddám J.-L., Yvon M., Michalakis Y., Gutiérrez S., Blanc S. (2015): Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View. *Journal of Virology* 89: 9719.
- Settlage S. B., See R. G., Hanley-Bowdoin L. (2005): Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions. *Journal of Virology* 79 (15): 9885–9895.
- Sharman M., Thomas J., Skabo S., Holton T. (2008): Abaca bunchy top virus, a new member of the genus Babuvirus (family Nanoviridae). *Archives of Virology* 153: 135–147.
- Stainton D., Kraberger S., Walters M., Wiltshire E. J., Rosario K., Halafihi M., Lolohea S., Katoa I., Faitua T. H., Aholelei W., Taufa L., Thomas J. E., Collings D. A., Martin D. P., Varsani A. (2012): Evidence of inter-component recombination, intra-

- component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. *Journal of General Virology* 93: 1103–1119.
- Stranger B. E., Forrest M. S., Dunning M., Ingle C. E., Beazley C., Thorne N., Redon R., Bird C. P., de Grassi A., Lee C., Tyler-Smith C., Carter N., Scherer S. W., Tavaré S., Deloukas P., Hurles M. E., Dermitzakis E. T. (2007): Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 315 (5813): 848–853.
- Sung Y. K., Coutts R. H. A. (1995): Pseudorecombination and complementation between potato yellow mosaic geminivirus and tomato golden mosaic geminivirus. *The Journal of General Virology* 76: 2809–2815.
- Syller J. (2012): Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular plant pathology*, 13 (2): 204–216.
- Šafář K., Seldenglanz M., Huňady I. (2019): Problematika kyjatyky hrachové v porostech hrachu setého. In: *Agromanual.cz* (online) (cit. 10. 4. 2021). Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/problematika-kyjatyky-hrachove-v-porostech-hrachu-seteho>.
- Tamura K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678–687.
- Timchenko T., Katul L., Aronson M., Vega-Arreguín J. C., Ramirez B. C., Vetten H. J., Gronenborn B. (2006): Infectivity of nanovirus DNAs: induction of disease by cloned genome components of Faba bean necrotic yellows virus. *Journal of General Virology* 87 (6): 1735–1743.
- Timchenko T., Katul L., Sano Y., de Kouchkovsky F., Vetten H. J., Gronenborn B. (2000): The master rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology* 274 (1): 189–195.
- Timchenko T., de Kouchkovsky F., Katul L., David C., Vetten H. J., Gronenborn B. (1999): A single Rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. *Journal of Virology* 73: 10173–10182.
- Thomas J. E. (2008). Banana bunchy top virus. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. (eds.): *Encyclopedia of Virology*, 3rd edition, pp. 385–39, Elsevier, Oxford.

- Thomas J. (2019): Banana bunchy top. In: Jones D. (ed.): Handbook of Diseases of Banana, Abacá and Enset, pp. 362–376, Wallingford, UK: CAB International.
- Thomas J. E., Gronenborn B., Harding R. M., Mandal B., Grigoras I., Randles J. W., Sano Y., Timchenko T., Vetten H. J., Yeh H.-H., Ziebel H., ICTV Report Consortium (2021): ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nanoviridae*. Journal of General Virology. (in press).
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673–80.
- Untiveros M., Fuentes S., Salazar L. F. (2007): Synergistic Interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyvirus Infecting Sweet Potato. Plant disease 91 (6): 669–676.
- Vetten H. J. (2008): Nanoviruses. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. (eds.): Encyclopedia of Virology, 3rd edition, pp. 385–39, Elsevier, Oxford.
- Vetten H. J. (2009): Nanoviruses. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. (eds.): Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, pp. 226–232, Elsevier, Oxford.
- Vetten H. J., Bressan A., Gronenborn B. (2016): Aphid transmission of viruses of the family Nanoviridae. In: Brown J. K. (ed.): Vector-mediated transmission of plant pathogens, pp. 453-462, American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Vetten H. J., Knierim D., Rakoski M. S., Menzel W., Maiss E., Gronenborn B., Winter S., Krenz B. (2019): Identification of a novel nanovirus in parsley. Archives of Virology 164: 1883–1887.
- Wanitchakorn R., Harding R. M., Dale J. L. (1997): Banana bunchy top virus DNA-3 encodes the viral coat protein. Archives of Virology 142: 1673–1680.
- Wickramaarachchi W. A., Shankarappa K. S., Rangaswamy K. T., Maruthi M. N., Rajapakse R. G., Ghosh S. (2016): Molecular characterization of banana bunchy top virus isolate from Sri Lanka and its genetic relationship with other isolates. Virusdisease 27 (2): 154–160.
- Wu B., Melcher U., Guo X., Wang X., Fan L., Zhou G. (2008): Assessment of codivergence of mastreviruses with their plant hosts. BMC Evolutionary Biology 8: 335.

- Wu R., Su H. (1990): Purification and characterization of banana bunchy top virus. *Journal of Phytopathology* 128: 153–160.
- Xu Y., Price B. D. (2011): Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10: 261–267.
- Ziebell H. (2017): Die Virusepidemie an Leguminosen 2016 eine Folge des Klimawandels? *Journal für Kulturpflanzen* 69 (2): 64–68.

## **Internetové zdroje**

CABI. Invasive Species Compendium. [online] (navštíveno 4. 11. 2020)

Dostupné z <https://www.cabi.org/ISC/>.

International Committee on Taxonomy of Viruses. [online] (navštíveno 24. 3. 2021)

Dostupné z <https://talk.ictvonline.org/>.

ÚKZUZ. Rostlinolékařský portál. [online] (navštíveno 10. 4. 2021)

Dostupné z [http://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/fy-public/](http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/fy-public/).

ViralZone. Expasy. [online] (navštíveno 29. 10. 2020)

Dostupné z <https://viralzone.expasy.org/>.