

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Michaela Němcová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně biologická charakteristika zástupců
rodu *Badnavirus*, čeleď *Caulimoviridae***

Bakalářská práce

Michaela Němcová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

PŘEDKLÁDÁ:	ADRESA	OSOBNÍ ČÍSLO
NĚMCOVÁ Michaela	. 132. Brníčko	R16719

TÉMA ČESKY:

Molekulárně biologická charakteristika zástupců rodu Badnavirus, čeleď Caulimoviridae.

TÉMA ANGLICKY:

Molecular and biological characterisation of badnaviruses (genus Badnavirus), family Caulimoviridae.

VEDOUCÍ PRÁCE:

Mgr. Dana Šafářová, Ph.D. - KBB

ZÁSADY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1. Vypracování rešerše shrnující poznatky o zástupcích rodu Badnavirus (Caulimoviridae), se zaměřením na jejich biologii, molekulárně genetickou charakteristiku a metody detekce.
2. Zvládnutí technik izolace DNA a RNA z rostlin, detekce viru pomocí PCR a elektroforetické separace, sekvenování PCR produktů, bioinformatická analýza
3. Analýza souboru vzorků bezu, skrining přítomnosti badnavirů, jejich případná molekulárně genetická charakteristika.

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY:

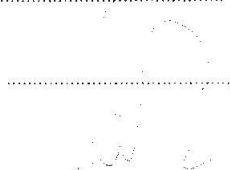
- Bhat A.I., Hohn T., Selvarajan R. (2016) Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses* 8(6). pii: E177.
- Bömer M., Turaki A.A., Rathnayake A.I., Silva G., Lava Kumar P., Seal S.E. (2018) Rolling circle amplification to screen yam germplasm for badnavirus infections and to amplify and characterise novel badnavirus genomes. *Bio-protocol* 8(1): e2672.
- Chiumenti M., Morelli M., De Stradis A., Elbeaino T., Staloni L., Minafra A. (2016) Unusual genomic features of a badnavirus infecting mulberry. *J Gen Virol.* 97(11):3073-3087.
- Rumbou A., Candresse T., Marais A., Theil S., Langer J., Jalakanen R., Büttner C. (2018) A novel badnavirus discovered from *Betula* sp. affected by birch leaf-roll disease. *PLoS One* 13(3):e0193888.
- Zhang Y., Singh K., Kaur R., Qiu W. (2011) Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* 101(9):1081-90.

Podpis vedoucího práce:



Datum: 13-04-2019

Podpis vedoucího pracoviště:



13-04-2019

Datum:

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení: Michaela Němcová

Název práce: Molekulárně biologická charakteristika zástupců rodu *Badnavirus*, čeleď *Caulimoviridae*

Typ práce: Bakalářská

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

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

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: dsDNA virus, bez černý, detekce, PCR, Sanger sekvenování, fylogenetická analýza

Počet stran: 46

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

Bakalářská práce charakterizuje zástupce rostlinných virů rodu *Badnavirus*, čeledi *Caulimoviridae* se zaměřením na jejich molekulární a biologické vlastnosti, a dále další zástupce rostlinných virů infikující bez černý (*Sambucus nigra* L.).

Teoretická část nejprve shrnuje obecné poznatky o čeledi *Caulimoviridae* a následně se věnuje detailnější charakteristice rodu *Badnavirus*. Zaměřuje se na interakci badnavirů s hostitelskou rostlinou, je popsán okruh hostitelů, symptomy virové infekce a způsoby přenosu viru, a dále organizace genomu s důrazem na variabilitu čtecích rámců a porovnání jednotlivých druhů. Popisuje metody detekce založené na jejich molekulárních a serologických vlastnostech. V textu jsou charakterizovány i ssRNA viry infikující bez černý z čeledi *Betaflexiviridae*, *Secoviridae* a *Tombusviridae*.

Praktická část je zaměřena na detekci nově zjištěného, doposud nepopsaného viru z rodu *Badnavirus* v souboru 96 vzorků planých a kulturních bezů černých původem z různých oblastí České republiky. Je porovnána genetická variabilita detekovaných izolátů, je provedena fylogenetická analýza a srovnání s dalšími zástupci rodu.

Biobibliographical identification

Author's first name and surname: Michaela Němcová

Title: Molecular and biological characterisation of badnaviruses (genus *Badnavirus*), family *Caulimoviridae*

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Keywords: dsDNA, elderberry, detection, PCR, Sanger sequencing, phylogenetic analysis

Number of pages: 46

Number of appendices: 0

Language: czech

Summary

This thesis focuses on plant viruses (genus *Badnavirus*, family *Caulimoviridae*), concentrating on molecular and biological characteristics of these viruses and the occurrence of one novel badnavirus in the Czech Republic. It further describes plant viruses infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.)

The theoretical part summarizes information about the family *Caulimoviridae* and further describes the genus *Badnavirus* and its members in detail. It is focused on host range, symptoms of infection, transmission, genome organization of these viruses with emphasis on its variability among the genus and detection methods. The text also characterizes ssRNA viruses of families *Betaflexiviridae*, *Secoviridae* and *Tombusviridae* infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.).

The experimental part is focused on the detection of a novel badnavirus in a set of 96 samples of wild and cultivated elderberry plants originating from various regions of the Czech Republic. The genetic variability of detected isolates is compared, phylogenetic analysis and comparison with other members of the genus are performed.

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

V Olomouci.....

.....

Michaela Němcová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za její odborný dohled a vedení, pomoc, cenné připomínky a v neposlední řadě také trpělivost a čas, který mi během práce na této bakalářské práci věnovala. Dále bych chtěla poděkovat paní Janě Veselské za její ochotu a pomoc během práce na praktické části mojí bakalářské práce a všem lidem, jejichž rady mi umožnily tuto práci dokončit.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Teoretický úvod.....	3
3.1	Charakteristika čeledi <i>Caulimoviridae</i>	3
3.1.1	Obecná charakteristika.....	3
3.2	Charakteristika rodu <i>Badnavirus</i>	4
3.2.1	Symptomy, hostitelský okruh a přenos.....	4
3.2.2	Výskyt a ekonomický význam.....	6
3.2.3	Organizace genomu.....	6
3.2.4	Zástupci rodu <i>Badnavirus</i>	7
3.2.5	Metody detekce badnavirů.....	10
3.3	Viry infikující bez černý (<i>Sambucus nigra</i> L.).....	13
3.3.1	Čeď <i>Betaflexiviridae</i>	13
3.3.2	Čeď <i>Secoviridae</i>	14
3.3.3	Čeď <i>Tombusviridae</i>	15
4	Materiál a metody.....	17
4.1	Biologický materiál.....	17
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	17
4.3	Izolace DNA.....	18
4.4	PCR detekce badnaviru bezu černého.....	19
4.5	PCR amplifikace genomických fragmentů badnaviru bezu.....	20
4.6	Elektroforetická separace.....	21
4.7	Izolace PCR produktu z gelu.....	21
4.8	Sanger sekvencování.....	22
4.9	Bioinformatická analýza.....	22
5	Výsledky.....	24
5.1	Detekce sledovaného badnaviru.....	25
5.2	Genetická analýza detekovaného viru.....	33
6	Diskuze.....	37
7	Závěr.....	39
8	Literatura.....	40

Seznam symbolů a zkratek

AMMV - Atractylodes mild mottle virus
AnBSV - Angelica bushy stunt virus
BFDaV - Blueberry fruit drop associated virus
BLRaV - Birch leaf roll associated virus
BSD - Banana streak disease
BSGFV - Banana streak GF virus
BSIMV - Banana streak IM virus
BSOLV - Banana streak OL virus
BSV-Acum - Banana streak virus Acuminata Yunan
CaBV1 - Camellia badnavirus 1
CaMV - Cauliflower mosaic virus
CERV - Carnation etched ring virus
CLNV - Cycad leaf necrosis virus
CLRV - Cherry leaf roll virus
CoYMV - Commelina yellow mottle virus
CPMMV - Cowpea mild mottle virus
CRLV - Cherry rasp leaf virus
CRVBV - Cacao red vein-banding virus
CSSV - Cacao swollen shoot virus
CYMV - Citrus yellow mosaic virus
CYVBV - Cacao yellow vein banding virus
DaBV - Dioscorea alata bacilliform virus
DbBV - Dioscorea bulbifera bacilliform virus
DBSNV - Dioscorea bacilliform SN virus
DBV - Dioscorea bacilliform virus
DsBV - Dioscorea sansibarensis
ElAV1 - Eldeberry aureusvirus 1
ElSV - Elderberry symptomless virus
ElVA - Elderberry virus A
ElVB - Elderberry virus B
GRLDaV - Grapevine Roditis leaf discoloration associated virus
GVBaV - Gooseberry vein banding associated virus
GVCV - Grapevine vein clearing virus
HRLV - Horseradish latent virus
ORF - Otevřený čtecí rámeček (Open reading frame)
PVBV - Pelargonium vein banding virus

PYMaV - Pagoda yellow mottle associated virus
PYMoV - Piper yellow mottle virus
RCBV - Red clover bacilliform virus
RTBV - Rice tungro bacilliform virus
RYMV - Rubus yellow mottle virus
RYNV - Rubus yellow net virus
SCBMV - Sugarcane bacilliform Mor virus
SCBV - Sugarcane bacilliform virus
SPCaLV - Sweet potato caulimo-like virus
SVBV - Strawberry vein banding virus
TaBCHV - Taro bacilliform CH virus
TaBV - Taro bacilliform virus
TBRV - Tomato black ring virus
TRSV - Tomato ring spot virus
YNMoV - Yacon necrotic mottle virus

Seznam obrázků

Obrázek 1: Detekce sledovaného viru pomocí specifických primerů 5UP a 5DW.....	25
Obrázek 2: Detekce sledovaného viru pomocí specifických primerů 3UP a 3DW.....	26
Obrázek 3: Detekce sledovaného viru pomocí primerů 5UP a 5DW v inokulovaných rostlinách.....	32
Obrázek 4: Fylogenetická analýza získané parciální sekvence ORF3 izolátů B5, B13 a B259.....	34
Obrázek 5: Fylogenetická analýza získané sekvence ORF5 izolátů B5, B13 a B259.....	36

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi pro detekci badnaviru	20
Tabulka 2: Teplotní profil PCR reakce pro detekci badnaviru	20
Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci virové DNA.....	20
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro přípravu vzorku na sekvencování	22
Tabulka 5: Seznam testovaných rostlin bezu a jejich původ.....	24
Tabulka 6: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Čechy	27
Tabulka 7: Detekce viru v rostlinách bezu, střední Morava	28
Tabulka 8: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Morava	30
Tabulka 9: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Morava (pokračování).....	31
Tabulka 10: Detekce viru v kulturních rostlinách bezu, cv. Dana a Bohatka	31
Tabulka 11: Detekce viru v kulturních rostlinách bezu, cv. Dana a Bohatka (pokračování).....	32

1 Úvod

Badnaviry představují skupinu rostlinných pararetrovirů rozšířených převážně v tropických a subtropických oblastech, v poslední době však dochází k detekcím nových druhů badnavirů i ve střední Evropě. Projev virové infekce se liší v závislosti na druhu viru, druhu hostitelské rostliny a podmínkách prostředí, ve kterém se rostlina nachází. Mezi nejčastější příznaky virové infekce badnaviry patří chlorotické skvrny, prosvětlování žilek, deformace listů, mozaiky na listech a snížená vitalita, které mají společně za důsledek snížení výnosu hospodářsky důležitých plodin. Vegetativní propagace rostlin je jednou z hlavních příčin šíření badnavirů, výzkumy však potvrdily i vektorový přenos a přenos pomocí semen.

Komplikací při detekci badnavirů je jejich schopnost rekombinace do genomu hostitelské rostliny. Virus se tak vyskytuje nejen ve formě episomální, ale také endogenní. V tomto případě se pak rostlina jeví jako zdravá a k projevům infekce dochází při vystavení rostliny stresovým faktorům.

Při studiu nového druhu je klíčem k jeho detekci izolace nukleové kyseliny a zjištění její sekvence sekvenačními metodami, následné navržení specifických párů primerů a samotná detekce pomocí PCR. Fylogenetická analýza případně získaných sekvencí přináší informace o příbuznosti viru s dalšími zástupci konkrétního rodu, případně čeledi.

2 Cíle práce

Cílem první části této bakalářské práce je vypracování literární rešerše shrnující poznatky o zástupcích rodu *Badnavirus* (*Caulimoviridae*), se zaměřením na jejich molekulárně genetickou charakteristiku a dále na metody jejich detekce.

Cílem praktické části je analýza souboru vzorků bezu černého (*Sambuccus nigra*) z různých oblastí České republiky, skrínig přítomnosti badnavirů a jejich molekulárně genetická charakteristika.

3 Teoretický úvod

3.1 Charakteristika čeledi *Caulimoviridae*

3.1.1 Obecná charakteristika

Čeď *Caulimoviridae* zahrnuje rostlinné pararetroviry, jejichž viriony jsou neobalené a v závislosti na rodu můžeme pozorovat dva typy virových částic. V rámci čeledi *Caulimoviridae* rozlišujeme v dnešní době 10 rodů, kdy rody *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus* a *Soymovirus* jsou charakteristické izometrickým tvarem virových částic, zatímco viriony rodů *Badnavirus* a *Tungrovirus* tvarem baciliformním. Nově byly také přidány rody *Dioscavirus* a *Vaccinivirus*. Velikost virionů je variabilní. Viry s baciliformními částicemi pozorujeme jako viriony o průměru 30 nm a délce 60 až 900 nm, u rodů se sférickými částicemi se pak setkáváme s viriony o průměru 45 až 50 nm. Virové částice jsou velmi stabilní, vyskytují-li v prostředí, jehož pH se pohybuje mezi pH4 až pH9, a také v prostředí s vysokým obsahem solí (ICTV, 2020; ViralZone, 2020).

Viriony obsahují jednu molekulu nekovalentně uzavřené kruhové molekuly dsDNA o velikosti 7,2–9,2 kbp. Na specifických místech obou vláken genomu se nachází tzv. diskontinuity. Záporně orientované vlákno obsahuje jednu diskontinuitu a kladně orientované vlákno jednu až tři diskontinuity. Genom je charakteristický přítomností jednoho až osmi otevřených čtecích rámců (ORF), kdy se počet těchto ORFs liší v závislosti na jednotlivých druzích. Produkty kódované virovou DNA společně pro všechny druhy v rámci čeledi *Caulimoviridae* jsou pohybový protein, obalový protein, víceúčelový protein asociovaný s viriony, asparagová proteáza a reverzní transkriptáza s asociovanou RNázovou H1 aktivitou. Organizace genomu je závislá na druhu a je jednou z hlavních charakteristik, podle kterých se jednotlivé druhy navzájem rozlišují (ICTV, 2020; ViralZone, 2018).

Viriony se po vstupu do buňky hostitelské rostliny pomocí signálu lokalizujícího jádro (NLS), který se nachází na N-konci obalového proteinu a je vystaven na povrchu virionu, dostává k jádru buňky. Zde se přiblíží k jadernému póru, dojde k jeho rozložení a uvolnění virové DNA do jádra. Diskontinuity nacházející se v genomu jsou uceleny a dochází k formaci super-svinuté DNA, která se sdružuje s histonovými proteiny a tvoří v jádře tzv. minichromozómy. Tyto chromozómy jsou transkribovány hostitelskou DNA-dependentní RNA polymerázou za vzniku transkriptu (35S nebo 34S RNA), který je, v závislosti na druhu, delší než samotný genom asi o 35–270 nt. Transkript slouží jako templát pro reverzní transkripci, jejíž činností vzniká záporně orientované vlákno DNA, a jako polycistronická mRNA sloužící k expresi ORFs (ICTV, 2018; ViralZone, 2018).

Během standardního replikačního cyklu pararetrovirů, na rozdíl od retrovirů, ve většině případů nedochází k integraci virálního genomu do genomu hostitele. Místo toho se akumuluje v hostitelském jádře ve formě minichromozomů. Syntéza obou vláken DNA je zajištěna virovou reverzní transkriptázou a RNázou H1 (ICTV, 2018).

Většina druhů v rámci této čeledi má velice úzký hostitelský okruh. Zástupci rodů *Petuvirus*, *Symovirus* a *Cavemovirus* napadají pouze dvouděložné rostliny, rod *Tungrovirus* napadá rostliny jednoděložné, a zástupci rodu *Badnavirus* jsou schopni infekce jak dvouděložných, tak i jednoděložných rostlin. Zástupce čeledi *Caulimoviridae* můžeme najít téměř po celém světě. Rody *Tungrovirus* a *Badnavirus* se primárně vyskytují v tropických a subtropických oblastech, ale některé jejich zástupce je možné najít i v mírném a subantarktickém pásmu, zatímco rody *Petuvirus*, *Caulimovirus*, *Soymovirus* a *Cavemovirus* jsou rozšířeny pouze v oblastech mírného pásma. Symptomy infekce vyvolané těmito viry se liší v závislosti na druhu viru, hostitelské rostlině a podmínkách, ve kterých se hostitelská rostlina vyskytuje. Nejčastěji zastoupenými symptomy mezi rody *Petuvirus*, *Caulimovirus*, *Soymovirus* a *Cavemovirus* jsou mozaiky a prosvětlování žilek napadených rostlin. Rody *Badnavirus* a *Tungrovirus* jsou charakteristické způsobováním chlorotických skvrn a pruhů podél žilnatiny (ICTV, 2020).

3.2 Charakteristika rodu *Badnavirus*

3.2.1 Symptomy, hostitelský okruh a přenos

Způsob projevu infekce badnaviry na hostitelské rostlině je velmi variabilní. Liší se v závislosti na druhu viru, druhu hostitelské rostliny a také na podmínkách prostředí, ve kterém se rostlina nachází. Chlorotické skvrny, prosvětlování žilek, deformace listů, mozaiky na listech, zakrslost a snížená vitalita jsou nejčastěji pozorovatelné symptomy na úrovni celého organismu u rostlin, ve kterých byla přítomnost badnavirů potvrzena. Zakrslost, mozaiky a senescence v pokročilých stádiích byly pozorovány v případě red clover bacilliform virus (RCBV) (Fránová a Jakešová, 2012). Rubus yellow mottle virus (RYMV) je zodpovědný za prosvětlování žilek u maliníku obecného (Kalischuk *et al.*, 2008). Piper yellow mottle virus (PYMoV) napadající rostliny černého pepře u těchto rostlin podněcuje vznik chlorotických lézí, prosvětlování žilek, svinutí listů, omezení tvorby plodů a celkové snížení vitality rostliny (Deeshma a Bhat, 2017). Skupina virů napadající banánovník (*Musa* sp.), tzv. banana streak viruses (BSVs), je charakteristická pro způsobování infekcí projevujícími se jako bílé až žluté chlorotické pruhy na listech napadených rostlin, které se v pokročilejších stádiích mění v nekrotické léze, které na starších listech způsobují charakteristické černé pruhy. Dále dochází k rozštěpení pseudostemu, redukcii rostlinného vzrůstu, zmenšení a malformaci plodů, opoždění rozkvětu a konečně ke kolapsu celé rostliny (Lockhart, 1986; Geering *et al.*, 2005). Pro značnou část rostlin napadených badnaviry však platí, že k projevu infekce za jistých podmínek nedochází. Tato situace nastává, vyskytuje-li se virus jako sekvence zakomponovaná v genomu hostitelské rostliny, tedy v jeho tzv. endogenní formě. Symptomy mohou být pozorovány až poté, co je rostlina vystavena nepříznivým vlivům, jako jsou například výkyvy teplot nebo nedostatek živin, a dojde k expresi epizomální formy viru (Bhat *et al.*, 2016).

Badnaviry můžeme detekovat jak u jednoděložných, tak i dvouděložných rostlin, přičemž hostitelský okruh jednotlivých zástupců badnavirů je velmi úzký. Většinou nacházíme viry přirozeně přítomny

pouze u jednoho nebo velmi malého počtu druhů hostitelů charakteristických pro konkrétní virus. Podle hostitelské rostliny a symptomů vyvolaných infekcí virem je pak odvozen samotný název viru. Na příklad cacao swollen shoot virus (CSSV) se přirozeně vyskytuje pouze na kakaovníku (*Theobroma cacao*) a několika dalších hostitelích, jako je baobab (*Adansonia digitata*), kapok (*Ceiba pentandra*) nebo kolovník (*Cola gigantea*, *C. chlamydanta*) (Friscina *et al.*, 2017). Banana streak disease (BSD) je infekce postihující banánovníky (*Musa* sp.), jejímž původcem je banana streak virus (Lockhart, 1986).

Primárně dochází k přenosu badnavirů při vegetativní propagaci rostlin (Bhat *et al.*, 2016). Vzhledem k tomu, že roubování patří k nejčastějším metodám množení rostlin, dochází k šíření badnavirů touto cestou velice snadno. Přenos virových částic roubováním byl prokázán v případě birch leaf roll-associated virus (BLRaV), kdy tímto způsobem došlo k přenosu viru na neinfekční sazenice břízy (*Betula* sp.), u které byly později pozorovány příznaky birch leaf roll disease. BLRaV je zatím jediný badnavirus infikující břízy (*Betula* sp.) (Rumbou *et al.*, 2018). Pomocí roubování bylo také potvrzeno, že za prosvětlování žilek listů vinné révy (*Vitis vinifera*) je zodpovědný grapevine vein-clearing virus (GVCV) (Zhang *et al.*, 2011).

Několik málo druhů je však také přenositelných pomocí semen. Tento způsob přenosu je charakteristický na příklad pro cacao swollen shoot virus (CSSV) (Quainoo *et al.*, 2008), piper yellow mottle virus (PYMoV) (Deeshma a Bhat, 2017) nebo taro bacilliform virus (TaBV) (Macanawai *et al.*, 2005). V případě red clover bacilliform virus (RCBV), což je zatím jediný detekovaný zástupce badnavirů parazitující na krmných plodinách, byl úspěšně proveden experimentální přenos pomocí inokulace na *Nicotiana occidentalis* (Fránová a Jakešová, 2012). Jediným dalším známým virem, u kterého byl proveden přenos tímto způsobem je kalanchoe top spotting virus (Lockart a Ferji, 1988).

Dalším způsobem přenosu badnavirů je vektorový přenos. Jedním z živočišných druhů, u kterého byla schopnost přenosu virové infekce prokázána, jsou vlnatky. Experimenty prokázaly, že virus může být semi-persistentně přenosný vícero druhy vlnatek, nebo naopak pouze jedním konkrétním druhem. *Ferrisia virgata* byla potvrzena jako možný vektor přenosu badnaviru, serologicky příbuzného s banana streak virus (BSV) a sugar-cane bacilliform virus (ScBV), z hostitelské rostliny černého pepře (*Piper nigrum* L.) na sazenice (Bhat *et al.*, 2003). Přenos z infikovaných rostlin byl také potvrzen v případě piper yellow mottle virus (PYMV), kdy byla jako vektor použita *Planococcus citri* (Lockhart *et al.*, 1997). Druhým živočišným druhem, který je spojován s vektorovým přenosem badnavirů, jsou mšice. Gooseberry vein banding associated virus je semi-persistentně přenášen různými druhy mšic, mezi které patří *Aphis grossulariae*, *Nasonovia ribisnigri* nebo zástupci rodu *Hyperomyzus* (Adams *et al.*, 1987). Experimentální přenos piper yellow mottle virus (PYMV) byl úspěšně proveden pomocí *Diconocoris distantis* (čeleď síťnatkovití), parazitující na černém pepři (*Piper nigrum*).

3.2.2 Výskyt a ekonomický význam

Badnaviry se převážně vyskytují v tropických a subtropických oblastech Afriky, Asie, Evropy a Jižní a Severní Ameriky. Většina druhů napadá hospodářsky důležité plodiny, mezi které patří banány, černý pepř, citrusy, kakao, cukrová třtina, taro a sladké brambory (Bhat *et al.*, 2016). V posledních letech se však setkáváme s případy výskytu i v mírném pásmu, jako je tomu například u birch leaf roll-associated virus (BLRaV), red clover bacilliform virus (RCBV) nebo rubus yellow net virus (RYNV) (Kalischuk *et al.*, 2008; Fránová a Jakešová, 2012; Rumbou *et al.*, 2018).

3.2.3 Organizace genomu

Genom badnavirů je tvořen kružnicovou dvouvláknovou molekulou DNA, přičemž jeho velikost dosahuje v závislosti na konkrétním viru 7,2–9,2 kb. Genom je dále charakteristický výskytem takzvaných diskontinuit, které se nachází na obou vláknech molekuly a které vznikly jako důsledek procesu reverzní transkripce (ViralZone, 2020). Tyto diskontinuity jsou po vstupu virionu do hostitelské buňky zaceleny a dochází tak k vytvoření svinuté struktury DNA, která je v jádře hostitelské DNA pozorovatelná jako minichromozomy. Následuje transkripce pomocí hostitelské DNA-dependentní RNA polymerázy, jejíž výsledkem je transkript o větší délce, než je délka samotného genomu viru (35S nebo 34S RNA). Nadměrná délka transkriptu je zapříčiněna přítomností nadbytečných sekvencí o velikosti 35–270 nukleotidů, v závislosti na druhu, a které se nacházejí na obou koncích. Tento transkript je dále využit pro přepis ORF (otevřený čtecí rámec) nebo jako templát pro reverzní transkripci, kdy dochází k přepisu této RNA molekuly zpátky do dsDNA za použití reverzní transkriptázy. Genom všech druhů badnavirů obsahuje alespoň tři otevřené čtecí rámce (ICTV, 2020).

Referenční druh *Commelina yellow mottle virus* (ComYMV) obsahuje ve svém genomu tři ORFs. ORF I je 602 bp dlouhý a je přepisován do polypeptidu o molární hmotnosti 23 kDa, jehož funkce je asociována s viriony. Produkt ORF II, o molární hmotnosti 15 kDa, je také spojován se strukturou virionu. (Cheng *et al.*, 1996). ORF III kóduje polyprotein, který je dále štěpen na další produkty, jako je reverzní transkriptáza, proteáza, ribonukleáza H a obalový protein. Post-translační úprava asparagovou proteázou dává vzniku jednotlivým proteinům (Medberry *et al.*, 1990).

Někteří zástupci badnavirů mají ve svém genomu ještě další, dodatečné ORFs. Piper yellow mottle virus (PYMoV), yacon necrotic mottle virus (YNMoV), grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV), dioscorea bacilliform SN virus (DBSNV) a taro bacilliform virus (TaBV) mají každý jeden další čtecí rámec (Yang *et al.*, 2003; Seal a Muller, 2007; Hany *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Maliogka *et al.*, 2015). Dva dodatečné čtecí rámce byly pozorovány u cacao swollen shoot virus (CSSV) a pagoda yellow mosaic associated virus (PYMaV) (Hagen *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2014.), zatímco citrus yellow mosaic virus (CYMV) a taro bacilliform CH virus (TaBCHV) mají ve svém genomu další tři otevřené čtecí rámce (Borah *et al.*, 2009; Kazmi *et al.*, 2015). Nejvyšší počet ORFs je zaznamenán na příklad v případě RYNV, který má celkově sedm otevřených čtecích rámců (Kalischuk *et al.*, 2013). Výsledkem

transkripce u rostlinných pararetrovirů je produkt, který obsahuje vysoce strukturovanou oblast o velikosti asi 600 nukleotidů. Tato oblast obsahuje množství krátkých ORFs, což jí dává potenciál k vytvoření vlásenkových struktur, které nemohou být podrobeny translaci. Vytvoření těchto vlásenkových struktur následně vede k tomu, že se první dlouhý čtecí rámec dostává do blízkosti pátého konce proximálního čtecího rámce, který končí 5–10 nukleotidů v protisměru stabilního strukturního elementu. Při skenování vlákna transkriptu ribozomem dochází k přeskočení tohoto elementu, což umožní translaci právě prvního dlouhého čtecího rámce (Ryabova a Hohn, 2000).

Kromě episomální formy virů můžeme v případě rodů *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Petuvirus* a *Cavemovirus* pozorovat také formy endogenní, a to právě tehdy, dojde-li k integraci virové DNA do jaderného genomu hostitelského organismu. Jelikož během replikačního cyklu badnavirů nedochází k integraci virové DNA do hostitelského genomu obligátně, jako tomu je u retrovirů, nazýváme je spolu s dalšími výše zmíněnými rody endogenní pararetroviry (EPRVs) (ICTV, 2020). Rod *Florendovirus*, který obsahuje 34 různých druhů, byl dokonce pozorován pouze jako endogenní forma (Geering *et al.*, 2014). Původně kruhovitá molekula virové DNA se v hostitelském genomu vyskytuje ve formě lineárních fragmentů. Integrace virové DNA do genomu hostitelské rostliny je způsobena procesem rekombinace, přičemž přítomnost endogenní formy viru není nutně asociovaná s infekcí. V rámci endogenní formy pararetrovirů tedy rozlišujeme, způsobuje-li virus infekci či nikoliv. Projev infekce za přítomnosti endogenní formy viru byl zaznamenán u BSOLV (Banana streak OL virus), BSGF (Banana streak GF virus) a BSIMV (Banana streak IM virus) (Chabannes *et al.*, 2013). Hybridní druhy banánovníků vzniklé křížením *Musa acuminata* a *Musa balbisiana* nesly znaky infekce BSV i přes to, že u rodičovských rostlin nebyly pozorovány žádné virové částice a k nákaze z vnějšího prostředí taktéž nedošlo. Tento fakt tedy vedl k hypotéze, že projev infekce BSV v hybridních rostlinách je zapříčiněn přítomností sekvencí virového genomu začleněných v genomu parentálních rostlin (Lheureux *et al.*, 2003).

3.2.4 Zástupci rodu *Badnavirus*

Rod *Badnavirus* podle poslední zprávy zahrnuje 46 druhů. Pro zavedení viru jako nového samostatného druhu existují jistá kritéria. První, pokud se sekvence nukleotidů shoduje méně jak z 80 % a druhé, kdy se sekvence aminokyselin v konzervativním místě kódujícím reverzní transkriptázu/ribonukleázu H shoduje méně jak z 89 %. (ICTV, 2020).

Banana streak viruses (BSVs)

Banana streak viruses (BSVs) patří mezi nejvíce prostudovanou skupinu badnavirů. Tato skupina virů, zodpovědná za 'banana streak disease' a způsobující chlorózy a nekrózy banánovníku, byla poprvé popsána a pojmenována v Maroku v roce 1985. Dnes už je přítomnost BSV potvrzena, kromě Maroka, i v mnoha jiných zemích, mezi které patří Indie, Malajsie, Čína, Indonésie, Filipíny, Vietnam, Thajsko, Srí Lanka nebo Austrálie (Borah *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014).

Symptomy pozorovatelné na hostitelské rostlině infikované tímto virem zahrnují chlorotické pruhy a vřetenovité léze, které posléze nekrotizují a černají, což způsobuje charakteristický vzhled starších listů. Výrazným rysem napadených rostlin je také nerovnoměrný výskyt příznaků infekce na rostlině. Symptomy můžeme na příklad pozorovat pouze na jednom listu nebo na více místech rostliny zároveň, oba případy potvrzují, že rostlina je infikována virem. Obecně také můžeme říct, že listy zakládané nebo tvořené infikovanou rostlinou během období vysokých teplot, vykazují výraznější příznaky infekce (Lockhart, 1986).

BSV je horizontálně a semi-perzistentně přenášen vlnatkami. Vzhledem k tomu, že se banánovníky (*Musa sp.*) pěstují na plantážích v blízkosti i jiných rostlin, byl proveden výzkum dokazující přenos episomálního BSV vlnatkami, které napadají právě tyto rostlinné druhy. Pozitivní výsledek přenosu eBSV byl zaznamenán u vlnatek napadající *Musa sp.* (*Pseudococcus elisae* a *Dysmicoccus brevipes*), *Manilkara zapota*, *Annona muricata*, *Ananas comosus* (*Dysmicoccus brevipes*) a *Nephelium napaceum*. Symptomy banana streak disease byly později pozorovány u všech rostlin, došlo tedy k úspěšnému přenosu aktivního viru (Sison *et al.*, 2017). Masová mikropropagace rostlin banánovníku, používaná jako hlavní způsob množení, je zodpovědná za vertikální přenos viru (Bhat *et al.*, 2016).

Cacao swollen shoot virus (CSSV)

Cacao swollen shoot virus je badnavirus napadající kakaovník pravý (*Theobroma cacao*) v zemích západní Afriky. Škody způsobené tímto virem značně ohrožují ekonomiku zemí, které kakaovníky pěstují (Quainoo *et al.*, 2008).

Přítomnost viru byla prokázána ve všech částech semen infikovaných rostlin kakaovníku (*Theobroma cacao*), což vedlo k provedení experimentu dokazujícího přenos viru během fertilizace. Jako nejpravděpodobnější zdroj infekce embrya se prokázalo osemení. Možné jsou tedy dva způsoby infekce semena – vznik zygoty splynutím infekčních gamet nebo infekce přes osemení (Quainoo *et al.*, 2008). CSSV je semiperzistentně přenášen *Planococcoides njalensis*, *Planococcus citri* a alespoň dalšími dvanácti druhy vlnatek (Roivainen, 1976). Šíření viru je způsobeno právě přenosem zprostředkovaným vlnatkami a obnovováním plantáží na místech, kde se infekce vyskytovala. Významným zdrojem infekce je však především zpracováním infikovaných rostlin, díky čemuž je virus šířen i na dlouhé vzdálenosti (Quainoo *et al.*, 2008).

Genom CSSV je velký asi 7,5 kb (Lot *et al.*, 1991) a obsahuje pět otevřených čtecích rámců, které se nazývají ORF I, ORF II, ORF III, ORF X a ORF Y a nacházejí se na pozitivním vlákně. ORF1 kóduje protein, o molární hmotnosti 16,7 kDa, s doposud nepopsanou funkcí (Hagen *et al.*, 1993). Protein kódovaný ORF2, o molární hmotnosti 14,4 kDa, je zodpovědný za vazbu nukleových kyselin (Jacquot *et al.*, 1996). Největší z pěti otevřených čtecích rámců je ORF3. Ten kóduje polyprotein o molární hmotnosti 211 kDa, který je dále štípan na jednotlivé produkty: protein pro pohyb viru z buňky do buňky, proteinázu, reverzní transkriptázu (RT) a ribonukleázu H. ORFX kódující protein o molární

hmotnosti 13 kDa a ORFY kódující produkt o molární hmotnosti 14 kDa, oba o neznámé funkci. ORFX a ORFY svojí polohou překrývají pozici ORF3 (Kouakou *et al.*, 2012; Oro *et al.*, 2012). V rámci druhu samotného panuje vysoká genetická variabilita. V oblastech východní Afriky, kde je virus nejvíce rozšířený, bylo identifikováno celkem 11 skupin CSSV – skupiny A, B a C v Togu (Oro *et al.*, 2012), B, D, E a F na území Pobřeží slonoviny (Kouakou *et al.*, 2012). Později byly detekovány skupiny A, B, C a E v Ghaně, spolu s poprvé detekovanými skupinami G, J, K, L a M (Abrokwah *et al.*, 2016).

Commelina yellow mottle virus (CoYMV)

Commelina yellow mottle virus je typovým zástupcem rodu *Badnavirus* (ViralZone, 2020). Okruh hostitelů je omezen pouze na jeden druh jednoděložných rostlin, a to *Commelina diffusa*. Genom CoYMV je velký 7 489 bp s 39,6% obsahem guaninu a cytosinu. Analýza sekvence genomu identifikovala pět možných otevřených rámců kódujících produkty o molární hmotnosti větší než 10 kDa. Tři z těchto otevřených čtecích rámců se nacházejí na pozitivně orientovaném vlákně a kódují proteiny o molárních hmotnostech 23, 15 a 216 kDa. Na mínusovém vlákně se nacházejí zbylé dva otevřené čtecí rámce (ORF x a ORF y), s potenciálními produkty o molární hmotnosti větší než 10 kDa, u kterých však nedochází k expresi (Medberry *et al.*, 1990). Pomocí protilátek připravených proti proteinům CoYMV bylo prokázáno, že produkty kódované ORF I a ORF II jsou asociované s viriony

a že ORF III kóduje plášťový protein (Cheng *et al.*, 1996). V nebuněčných extraktech z rostlin *Commelina diffusa* infikovaných CoYMV byly pozorovány tubulární struktury obsahující baciliformní viriony, kdy povrch těchto struktur reagoval s protilátkami proti CoYMV movement proteinu. Podobné tubulární struktury byly taktéž pozorovány v ultratenkých řezech nakažených rostlin. Zmíněná pozorování nasvědčují tomu, že tyto struktury tvořené z části movement proteinem slouží k přenosu CoYMV virionů mezi buňkami (Cheng *et al.*, 1998).

Dioscorea bacilliform virus (DBV)

Dioscorea bacilliform virus (DBV) se vyskytuje v oblastech jižní polokoule, kde běžně napadá několik druhů smlďince (*Dioscorea* sp.). Virová infekce se projevuje chlorotickou mozaikou na listech, která postupně vede ke snížení tvorby sacharidů a zásoby škrobu v hlízách, což vede k jejich nižší kvalitě a výtěžku. Virus je přenášen vegetativně nebo pomocí vlnatek (*Planococcus citri*) (Phillips *et al.*, 1999).

Na základě genetické variability rozlišujeme *Dioscorea alata bacilliform virus* (DaBV) a *Dioscorea sansibarensis bacilliform virus* (DsBV). Kompletní délka genomu DaBV byla pomocí sekvenování dvou izolátů pocházejících z Nigérie stanovena na 7 413 bp a 7 415 bp, v obou případech se v genomu nacházely tři otevřené čtecí rámce, jak je pro badnaviry charakteristické. Tyto ORFs potenciálně kódují produkty o molární hmotnosti 29,5 kDa, 25,2 kDa a 228,3 kDa (Bridson *et al.*, 1999). Genom DsBV se s genomem DBALV shoduje pouze z 62 % a byl tedy popsán jako nový druh. Sekvenování stanovilo

velikost genomu dvou izolátů tohoto badnaviru na 7 262 bp a 7 276 bp, přičemž se zde nachází čtyři otevřené čtecí rámce kódující produkty o délce 143, 126, 1 887 a 95 aminokyselin (Seal a Muller, 2007).

Piper yellow mottle virus (PYMoV)

Výskyt piper yellow mottle virus byl poprvé zaznamenán v roce 1997 v Malajsii, Filipínách, Thajsku a na Srí Lance, kde infikoval rostliny pepře černého (*Piper nigrum*) a pepřovníku betelového (*Piper betle*) (Lockhart *et al.*, 1997). Na rostlinách infikovaných tímto virem můžeme pozorovat chlorotické mozaiky, chlorózy, prosvětlování žilek a nízkou kvalitu plodů. Symptomy jsou však velice variabilní a síla jejich projevu se liší v závislosti na vnějších podmínkách, zvláště potom na teplotě (Umadevi *et al.*, 2016). PYMoV se primárně přenáší vegetativně nebo pomocí semen (Hareesh a Bhat, 2010; Deeshma a Bhat, 2014), zaznamenán byl však i vektorový přenos způsobený různými druhy vlnatek (*Plannococcus citri*, *Ferrisia virgata*) (Lockhart *et al.*, 1997; Bhat *et al.*, 2003).

Genom PYMoV je 7 622 bp velký a obsahuje čtyři otevřené čtecí rámce. ORF I, ORF II a ORF IV kódují produkty o molárních hmotnosti 15,7 kDa, 17,1 kDa a 17,9 kDa, funkce těchto proteinů však není dosud známá. ORF III kóduje polyprotein o velikosti 218,6 kDa, který je pro badnaviry charakteristický (Hany *et al.*, 2014).

3.2.5 Metody detekce badnavirů

Rod *Badnavirus* zahrnuje velké množství virů, které jsou vzájemně geneticky a serologicky odlišné. Velké rozdíly byly zjištěny i v rámci jednotlivých druhů. (Geering *et al.*, 2000, Borah *et al.*, 2013). Tento heterogenní charakter celého rodu značně komplikuje detekci založenou právě na serologických vlastnostech a vlastnostech DNA.

Detekce pomocí PCR

Jednou z nejčastěji používaných metod detekce badnavirů je PCR reakce. Základem použití této metody je v případě rostlinných virů úspěšná izolace nukleové kyseliny z rostlinného materiálu a její následné sekvenování, které je klíčové pro navržení detekčních primerů. Detekční primery bývají často navrhovány v oblasti ORF3, jelikož se jedná o velmi konzervativní oblast napříč badnaviry (Rumbou *et al.*, 2018). Na základě dostupných sekvencí regionů kódujících reverzní transkriptázu a ribonukleázu H některých zástupců badnavirů, byly navrženy degenerované detekční primery BadnaFP a BadnaRP, přičemž očekávaná délka aplikonu je 600 bp (Yang *et al.*, 2003). Tyto primery lze využít k detekci badnavirů jako skupiny, nikoliv pro detekci konkrétního badnaviru (Fránová a Jakešová, 2012). Pro detekci jednotlivých druhů jsou navrhovány specifické detekční primery – na příklad pro detekci rubus yellow net virus byly navrženy tři páry specifických primerů (RYN1, RYN2 a RYN3) s očekávanými velikostmi produktů 350, 501 a 398 bp (Jones *et al.*, 2002). PCR bylo dále užito na příklad při detekci grapevine vein clearing virus (Zhang *et al.*, 2011), nebo při potvrzení úspěšnosti vektorového přenosu episomálního banana streak virus (Sison *et al.*, 2017).

Dalším využitím PCR reakce v rámci studia rostlinných virů, se kterým se setkáváme, je kompletace genomů. V případě birch leaf roll-associated virus byl po zpracování NGS dat navržen pár specifických primerů (PolyBadna-F1/R1). Tyto vně směřující primery byly navrženy v konzervativních místech na pátém a třetím konci scaffoldů získaných technikou NGS za účelem zkompletování genomové sekvence sledovaného viru a potvrzení, že se jedná o kruhovou molekulu (Rumbou *et al.*, 2018).

ELISA (enzyme-linked immunoassay)

Přítomnost, příbuznost sledovaného viru s dalšími viry nebo jeho samotnou identitu lze také určit pomocí serologických metod. Jednou z těchto metod je DAC-ELISA (direct antigen-coated enzyme-linked immunoassay). Právě této metody bylo užito při studiu viru napadající pepř černý (*Piper nigrum* L.). DAC-ELISA byla aplikována za použití antisér proti badnavirům, cucumovirům, ilarvirům, potyvirům a tospovirům, získaných z Virology Unit, Indian Agricultural Research Institute. V rámci badnavirových antisér byla použita polyklonální antiséra (Bio-Rad, Phytodiagnostics) proti různým zástupcům, mezi které patřily CoYMV, BSV, RTBV a SCBV, přičemž sledovaný virus reagoval pouze s protilátkami proti BSV a SCBV, což značí jeho serologickou příbuznost s těmito dvěma viry (Bhat *et al.*, 2003). Další ověřování serologické příbuznosti badnavirů, konkrétně mezi BSV a SCBV a mezi CSSV, SRSV a DBV, infikující citrusy v Indii (Gaddam *et al.*, 2012), bylo provedeno pomocí 'Dot-blot' ELISA testu podle Bantari a Goodwin (1985). ELISA metoda je vhodná nejen pro detekci virových částic, ale také pro určení koncentrace antigenů v tkáních infikované rostliny. Pomocí TAS-ELISA ('triple antibody sandwich') (Thottappilly *et al.*, 1998) byla vyvozena závislost koncentrace virových antigenů na klimatických podmínkách v době sběru vzorků, typu infikované tkáně nebo genotypu rostliny. Určení vhodné tkáně a doby odběru je důležité pro správnou diagnostiku viru (Dahal *et al.*, 1998).

Pomocí ELISA metod lze také ověřit, zda se v infikované hostitelské rostlině nachází virus v jeho episomální nebo endogenní formě. Za tímto účelem bylo využito PAS-ELISA (protein A sandwich) metody při sledování výskytu badnaviru v rostlinách yamu v západní Africe (Seal *et al.*, 2014). Pro detekci byla použita dvě antiséra navržená speciálně proti badnavirům infikující yam (DaBV a DbBV) (Philips *et al.*, 1999) a antisérum proti badnavirům obecně (BenL). PAS-ELISA prokázala přítomnost virových částic v 60 % testovaných vzorků, zatímco PCR v 81 %. Porovnáním výsledků serologických a molekulárních technik lze vyhodnotit zastoupení episomální a endogenní formy viru v rostlině (Seal *et al.*, 2014).

RCA

'Rolling-circle amplification' je v poslední době velice často užívaná metoda pro detekci badnavirů a dalších virů s genomem tvořeným kruhovou DNA, jelikož předchází problému navrhování specifických primerů. RCA je metoda, která byla v minulosti využívána k amplifikaci a charakterizaci kruhovitých DNA molekul, včetně plasmidů (Dean *et al.*, 2001), a také lidských, živočišných

i rostlinných DNA virů (Johnne *et al.*, 2009). Nicméně bylo užití metody RCA v rámci rostlinných virů omezené pouze na malé, jednovláknové molekuly genomových DNA virů rodů *Geminiviridae* a *Nanoviridae*. Současný rozvoj metody umožňuje detekci virů s velkým genomem jako je například banana streak virus, a dokonce diferenciaci mezi episomálními a integrovanými virovými genovými sekvencemi, kdy výsledkem byla amplifikaci pouze episomálních genomových sekvencí. (James *et al.*, 2011). 'Multiply-primed rolling circle amplification' využívá jedinečných vlastností Phi29 DNA polymerázy a náhodných primerů k získání dlouhých nukleotidových sekvencí. Proces multiply-primed RCA umožňuje amplifikaci kruhové DNA přímo z buněk, jejímž výsledkem je templát vysoké kvality, který může být dále využit k DNA sekvencování, navrhování práb nebo klonování (Dean *et al.*, 2001).

3.3 Viry infikující bez černý (*Sambucus nigra* L.)

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je napadán celou řadou rostlinných virů náležících do různých čeledí. Virus patřící do čeledi *Caulimoviridae*, konkrétněji zatím nepopsaný virus rodu *Badnavirus*, který je předmětem této práce, je zatím jediným virem této čeledi napadající bez černý (*Sambucus nigra* L.) Pro veškeré dosud popsané virové infekce bezu platí, že jsou vyvolány pozitivně orientovanými ssRNA viry z čeledí *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Secoviridae*, *Tombusviridae* a *Virgaviridae* (Uyemoto, 1970)

3.3.1 Čeleď *Betaflexiviridae*

Čeleď *Betaflexiviridae* zahrnuje rostlinné viry, jejichž viriony jsou neobalené a lze je pozorovat jako vlákna o délce 600–1000 nm a průměru 12–13 nm. Viry této čeledi jsou charakteristické lineární pozitivně orientovanou ssRNA, jejíž velikost se pohybuje v závislosti na druhu od 5,9 do 9,0 kb. Molekula ssRNA je na 5'konci zakončena 7-methylguanoinovou čepičkou a na 3'konci polyA sekvencí. V rámci této čeledi rozlišujeme celkem 6 rodů: *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*. Viriony rodu *Carlavirus* jsou pozorovatelné jako vlákna dlouhá 610–700 nm a 12–15 nm v průměru. (ICTV, 2020; ViralZone 2020).

Elderberry symptomless virus (EISV)

Elderberry symptomless virus je virus příbuzný s viry rodu *Carlavirus*. Jednotlivé viry rodu *Carlavirus* mají obecně velmi úzký okruh přirozených hostitelů, i když v případě experimentálních přenosů je v některých případech hostitelský okruh široký. Vektorem společným pro většinu virových druhů jsou mšice, které infekci šíří neperzistentně. U jiných zástupců carlaviřů, jako je například *cowpea mild mottle virus* (CPMMV), se setkáváme s přenosem pomocí molic (*Bemisia tabaci*), nebo v případě *pea streak virus* a *red clover vein mosaic virus* se šířením semeny (Anno-Nyako, 1986, ICTV 2020).

EISV byl poprvé detekován a popsán roku 1966 v tehdejší Československu (Brčák *et al.*, 1966). Detekce tohoto viru byla původně popsána v případě asymptomatických keřů, později byly u keřů vykazujících příznaky jako chlorotické skvrny na listech a žluté mozaiky pozorovány obdobné částice (Van Lent *et al.*, 1980; Ellis, 1992). Tento virus byl úspěšně experimentálně přenesen mechanickou inokulací z keřů *S. nigra* a *S. racemosa* na řadu experimentálních bylinných indikátorů, mezi které patřily například *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* nebo *Cyamopsis tetragonoloba*, na kterých byly následně pozorovány chlorotické léze, chlorotické prstence a mozaiky. Pomocí mšic byl také úspěšně proveden vektorový přenos semiperzistentního charakteru (Van Lent *et al.*, 1980).

Sambucus virus C, D a E

Sambucus virus C, D a E jsou nově popsané virové druhy rodu *Carlavirus*. Velikost virových částí se pohybuje v rozmezí 8 540–8 628 nukleotidů (bez polyadenylovaných konců). Genom carlaviřů je charakteristický přítomností šesti ORFs v genomu. ORF1 kóduje virální replikázový protein o molární

hmotnosti 223 kDa, který zahrnuje konzervativní doménu pro methyltransferázu, 2-oxoglutarát a Fe²⁺ dependentní oxygenázu, endopeptidázu, virální RNA helikázu a RNA dependentní RNA polymerázu. Čtecí rámce ORFs 2,3 a 4, tzv. triple gene block (TGB), kódují proteiny o velikostech 25, 12 a 7 kDa související s pohybem virionu z buňky do buňky. Plášťový protein (34 kDa) je kódován ORF5 a zahrnuje dvě po sobě jdoucí domény pro plášťový protein – Flexi_CP_N a Flexi_CP. Čtecí rámec ORF6, který se překrývá se čtecím rámcem ORF 5, kóduje 11–16 kDa velký protein, tzv. nucleic acid binding protein (NAB), který hraje roli v umlčování genů (Zhou *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2016; ICTV 2018).

V současné době ještě popsání a navržení další dva zástupci, Elderberry virus A a Elderberry virus B, jejich druhový status však nebyl zatím potvrzen, z důvodu neúplného splnění podmínek pro popis nového druhu. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) udává pravidla, podle kterých je pro vymezení nových druhů rodu *Carlavirus* nutná alespoň 72% nukleotidová identita nebo 80% aminokyselinová identita v replikázovém nebo plášťovém proteinu. Elderberry virus A a B splňují podmínku 80% aminokyselinové identity v replikázovém proteinu, ale ne v CP (Ho *et al.*, 2016).

3.3.2 Čeleď *Secoviridae*

Secoviridae je čeleď nebalených virů s viriony ikosahedrického tvaru o velikosti 25–30 nm v průměru. Genom tvoří jedna nebo dvě (RNA-1 a RNA-2) pozitivně orientované molekuly ssRNA o velikostech 6–8 kb a 4–7 kb. RNA-1 a RNA-2 zároveň slouží jako mRNA a jsou translatovány do dvou polyproteinů, které jsou následně štěpeny na jednotlivé funkční produkty. RNA-1 kóduje proteiny potřebné pro replikaci viru, zatímco RNA-2 kóduje plášťový protein a movement protein (ViralZone, 2020).

Čeleď zahrnuje celkem 8 rodů, z čehož rody *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus* a *Torradovirus* nesou ve svém genomu dvě molekuly ssRNA a rody *Sequivirus* a *Waikavirus* molekulu jednu (ICTV, 2020). Pro bez černý (*Sambucus nigra* L.) jsou významní různí zástupci, z rodu *Nepovirus*: arabic mosaic virus (AMV), cherry leaf roll virus (CLR) a tomato ring spot virus (TRSV), z rodu *Cheravirus* pak cherry rasp leaf virus (CRLV) (Schwenk *et al.*, 1969; Uyemoto, 1970; Hansen *et al.*, 1974; Miličić *et al.*, 1987).

Cherry leaf roll virus (CLR)

Cherry leaf roll virus je celosvětově rozšířený a jeho hostitelský okruh je velmi široký. Přirozeně je CLRV přenášen pylem a semeny, taktéž byla úspěšně provedena mechanická inokulace experimentálních rostlin (Woo a Pearson, 2014). Infekce bezu černého (*Sambucus nigra* L.) CLRV byla poprvé popsána v roce 1968 na území tehdejší Jugoslávie (Plavšić-Banjac a Miličić, 1968). U infikovaných keřů bezu lze na listech pozorovat chlorotické mozaiky, chlorózy a snížení produkce plodů (Hansen a Stace-Smith, 1971; Berniak, 2016).

Jedna ze studií tohoto viru se uskutečnila na Novém Zélandu, kde bylo popsáno celkem šest izolátů: cherry leaf roll virus infikujících *Actinidia chinensis*, *Malus domestica*, *Ribes rubrum*, *Rumex obtusifolius* a *Vaccinium darrowii*. Genom je tvořen dvěma molekulami pozitivně orientovaných ssRNA. RNA-1 a RNA-2 jsou přibližně 8 kb a 7 kb dlouhé. Velikost ssRNA těchto izolátů se pohybuje v případě RNA1 v rozmezí 7 919–7 921 nukleotidů a v případě RNA-2 v rozmezí 6 361–6 363 nukleotidů bez polyA konců. Každá molekula RNA zahrnuje jeden otevřený čtecí rámec. ORF nacházející se na RNA-1 kóduje polyprotein P1 o délce 2 113 aminokyselin a RNA-2 protein P2 o délce 1 590 aminokyselin (Woo a Pearson, 2014).

Tomato black ring virus (TBRV)

První zmínka o infekci bezu černého (*Sambucus nigra* L.) tomato black ring virus pochází z roku 2004 (Pospieszny, 2004). Na infikovaných rostlinách byly pozorovatelné známky virové infekce jako chlorotické skvrny, mozaiky a prosvětlování žilek na listech. Mechanickou inokulací byl virus úspěšně přenesen na *Chenopodium* ssp., kde způsoboval chlorotické a nekrotické léze, a na tabák *Nicotiana* ssp., u kterého byly pozorovatelné charakteristické kruhové skvrny. Přítomnost viru v experimentálních hostitelích byla ověřena pomocí elektronové mikroskopie a ELISA testu (Pospieszny, 2004).

Infekce tímto virem může být doprovázena přítomností subvirálních částic, jako satelitní nebo defektní RNA, v infikované rostlině. Rostliny infikované izoláty, které obsahovaly defektní RNA, jevíly slabší příznaky virové infekce než ty, které byly infikovány izoláty bez malých RNA molekul (Rymelska, 2013).

3.3.3 Čeleď Tombusviridae

Viry této čeledi mají neobalené, sférické nebo ikosaherdické viriony a v průměru mají 28–34 nm. Genom je tvořen jednou lineární, pozitivně orientovanou molekulou ssRNA o velikosti 4–5,4 kb, s výjimkou rodu *Dianthovirus*, jehož genom je tvořen dvěma molekulami RNA o velikostech přibližně 3,8 kb a 1,4 kb. Na 5'konci se nenachází čepička a 3'konec není opatřen polyA sekvencí (ICTV, 2020; ViralZone, 2020).

Čeleď zahrnuje celkem 16 rodů: *Alphacarmovirus*, *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Avenavirus*, *Betacarmovirus*, *Betanecrovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Gammacarmovirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Pelarspovirus*, *Tombusvirus*, *Umbravirus* a *Zeavirus* (ViralZone, 2020). Infekce bezu černého (*Sambucus nigra* L.) byla popsána u rodů *Pelarspovirus*, *Betanecrovirus* a *Tombusvirus* (Uyemoto a Gilmer, 1971; Jones, 1972; Polák *et al.*, 1990).

Elderberry aureusvirus 1 (EIAV1)

Elderberry aureusvirus 1 je nově popsáný, doposud oficiálně nezařazený, virus náležící do rodu *Aureusvirus* (Šafařová *et al.*, 2018). EIAV1 byl poprvé detekován při skríningu keřů bezu černého (*Sambucus nigra* L.) rostoucích na dvanácti lokalitách tří různých regionů České republiky, zahrnující

jižní Čechy a střední a jižní Moravu. Testované keře, ve kterých byl sledovaný virus detekován, jevíly mírné známky virové infekce jako slabé chlorózy, difúzní chlorózy na listech a v některých případech neuniformní kvetení a dozrávání plodů, anebo byly bezpříznakové. Závažnější příznaky virové infekce (chlorózy, chlorotické prstence) byly taktéž pozorovány, ale v asociaci se směsnou infekcí dalšími viry jako elderberry virus A (EIVA), elderberry virus B (EIVB) anebo cherry leaf roll virus CLRV (Šafářová, *et al.* 2018). Přirozený hostitelský okruh jednotlivých zástupců skupiny *Aureusvirus* je často omezený pouze na jeden, maximálně dva hostitelské druhy, což platí i v případě EIAV1, kdy je prozatím znám jako jeho jediný hostitel bez černý (Šafářová *et al.*, 2018).

Velikost genomu typového izolátu EIAV1-B15 byla stanovena na 4 512 nukleotidů a zahrnuje pět ORFs s organizací charakteristickou pro aureusviry. První otevřený čtecí rámec, který má velikost 729 nukleotidů, kóduje protein asociovaný s replikací, o molární hmotnosti 26,5 kDa, a obsahuje pro tombusviry typickou p33 doménu. RNA-dependentní RNA polymeráza o molární hmotnosti 85,3 kDa je kódována 2 280 nukleotidů dlouhým ORF1-RT, který zahrnuje typickou RdRp doménu. ORF2 je 1 134 nukleotidů dlouhý a kóduje plášťový protein o molární hmotnosti 39,6 kDa s konzervativní doménou CP S. Pohybový protein (26 kDa) s doménou proteinu P21/22 je kódován 711 nukleotidů dlouhým ORF3, zatímco ORF4, který je dlouhý 387 nukleotidů, kóduje RNA silencing supresor (14 kDa) (Šafářová *et al.*, 2018).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části bakalářské práce bylo na přítomnost zatím nepopsaného viru rodu *Badnavirus* otestováno celkem 95 rostlin bezu černého (*Sambucus nigra* L.), jejichž listy byly odebrány z keřů vykazujících příznaky virové infekce a bezpříznakových keřů. Jednotlivé vzorky pocházely ze sběrů odebraných v letech 2015 až 2018 na lokalitách střední a jižní Moravy a jižních Čech. Po odebrání byly listy skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího použití. Do souboru testovaných vzorků byly zařazeny 3 rostliny *Nicotiana occidentalis* a hybridní rostlina *N. occidentalis* a *N. glutinosa*, které byly v rámci testování mechanického přenosu viru inokulovány inokulem získaným z infikované rostliny. (Přenosový experiment byl prováděn pracovníky laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, KBB, PřF UP).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agarosa (Ambresco, kat. č. 9012-36-2)
- Deionizovaná voda
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0241)
- GelRed™ Nucleid Acid Stain (Biotium, kat. č. 41003)
- Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide) - $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vodný roztok (ThermoFisher, kat. č. H3569)
- Isopropanol (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0)
- MyFi™ DNA Pokymerase (Bioline, kat. č. BIO-21118)
- MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline, kat. č. BIO-21106)
- Specifické primery navržené pracovníky laboratoře molekulární biologie mikroorganismů (KBB PřF UP)
- UltraPure™ Ethidium Bromide, $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (ThermoFisher, kat. č. 15585011)
- 70% ethanol (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99-M1000-1)

Použité soupravy

- The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher, kat. č. 4337457)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, kat. č. 27106)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28704)

Použité roztoky

- 50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustit v 800 ml dH₂O, přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit dH₂O do 1000 ml.
- 1x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 20 ml 50x TAE doplnit dH₂O.

Použité přístroje

- Analytické váhy 440-33 N (Kern)
- Centrifuga Biofuge pico (Heraus)
- Centrifuga Spectrafuge 24D (LABNET)
- Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)
- Fluorimetr DynaQuant DQ 200 (Amersham Biosciences)
- Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomdicals)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- Minicentrifuga Spectrafuge™ 16M (Labnet)
- NanoDrop 1000 Thermo Scientific Spectrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Přístroj na výrobu ledu (Icematic)
- Termocyklér T100 (BIO-RAD)
- UV transluminátor UVT-14L (Herolab)
- Dokumentační systém G: BOX se softwarem GeneSnap (Syngene)
- Vortex TTS 2 Yellowline (Maneko)
- Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing Block MB-102 (BIOER)
- Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)

4.3 Izolace DNA

DNA byla izolovaná z listů pomocí kitu QIAPrep Spin Miniprep Kit, podle modifikovaných pokynů výrobce. Izolace proběhla následovně:

1. Přibližně 60 mg listu bylo přeneseno do homogenizační zkumavky s 250 µl pufru P1 a keramickou homogenizační kuličkou, a následně homogenizováno v homogenizátoru FastPrep24.
2. Zhomogenizovaný materiál byl pomocí mikropipety přenesen do 1,5ml mikrozukavky typu Eppendorf.
3. Ke zhomogenizovanému materiálu bylo přidáno 250 µl pufru P2 a následně byl obsah mikrozukavky jejím opatrným převrácením (10x) promíchán.
4. Lýze probíhala maximálně 5 min.
5. Do mikrozukavky bylo přidáno 350 µl pufru N3 a následným převrácením zkumavky (10x) byl obsah promíchán.

6. Obsah zkumavky byl centrifugován 5 min při 13 000 rpm ve stolní centrifuze.
7. Vzniklý supernatant obsahující DNA byl přepipetováním aplikován na QIAprep spin kolonu.
8. Supernatant byl centrifugován 1 min při 13 000 g. Kapalný obsah zkumavky byl odstraněn.
9. QIAprep spin kolona byla promyta přidáním 0,5 ml pufru PB a centrifugací po dobu 1 min při 13 000 g. Kapalný obsah byl odstraněn.
10. QIAprep spin kolona byla promyta přidáním 0,75 ml pufru PE a centrifugací po dobu 1 min. Tento krok byl opakován dvakrát.
11. Kapalný obsah mikrozkušavky byl odstraněn a mikrozkušavka byla znovu centrifugována po dobu 1 min.
12. QIAprep kolona byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky, na QIAprep kolonu bylo naneseno 50 µl EB pufru a ponechána 1 min stát, rozpuštěná DNA byla uvolněna do mikrozkušavky centrifugací po dobu 1 min při 13 000 g.
13. Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000, ThermoScientific).

Vyizolovaná DNA byla následně ihned použita pro detekci viru nebo dlouhodobě uložena při teplotě -20°C.

4.4 PCR detekce badnaviru bezu černého

Přítomnost sledovaného viru v testovaných rostlinách byla zjišťována za pomoci PCR reakce. Pro detekci viru byla tedy použita PCR s pomocí kombinace primerů 5UP a 5DW anebo 3UP a 3DW a za použití MyTaq™ DNA polymerázy (Bioline). Veškeré kroky přípravy PCR reakční směsi byly provedeny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Samotná PCR reakce probíhala v termocykléru BIO-RAD T100™ ThermalCycler.

Pro PCR byla připravena reakční směs s ohledem na množství testovaných vzorků obsahující jednotlivé složky a specifické primery 5UP (f primer) a 5DW (r primer), anebo 3UP (f primer) a 3DW (r primer). Ta byla dále rozpipetována po 18 µl do 0,2ml mikrozkušavek. Následně byly do každé mikrozkušavky přidány 2 µl vyizolované DNA. Složení reakční směsi a podmínky PCR reakce viz Tabulka 1 a 2.

Tabulka 1: Složení PCR reakční směsi pro detekci badnaviru

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Objem pro 1 test [μ l]
Puf	5x	4,00
Destilovaná voda		13,60
f primer	20 pmol· μ l ⁻¹	0,10
r primer	20 pmol· μ l ⁻¹	0,10
Taq DNA polymeráza	5 U· μ l ⁻¹	0,20
Celkem		18

Tabulka 2: Teplotní profil PCR reakce pro detekci badnaviru

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1x
Dentaurace	95 °C	30 s	
Nasedání primerů	52 °C	30 s	35x
Elongace	72 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	1x

4.5 PCR amplifikace genomických fragmentů badnaviru bezu

Za účelem sekvencování virové DNA byla znovu provedena PCR vzorků B5, B13 a B259 s pozitivním nálezem sledovaného viru. Pro amplifikaci vybraných částí genomu viru bylo použito specifických párů primerů, konkrétně UP6/DW3, UP1/DW3, UP3/6DWsp, DW2/9DW, UP9/DW7a, 10UP/DW7 a 9UP/DW7, navržených pracovníky laboratoře molekulární biologie mikroorganismů (KBB PřF UP) na základě HTS sekvenčních dat, amplikony byly získány pomocí MyFiTM DNA polymerázy (Bioline). Složení PCR reakční směsi viz Tabulka 3.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro amplifikaci virové DNA

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Objem pro 1 test [μ l]
Puf	5x	5,00
Destilovaná voda		16,50
f primer	20 pmol· μ l ⁻¹	0,25
r primer	20 pmol· μ l ⁻¹	0,25
MyFi DNA polymeráza	2 U· μ l ⁻¹	1,00
Celkem		23

4.6 Elektroforetická separace

Výsledky PCR amplifikace byly analyzovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu (Agarose I, AMRESCO) v 1x TAE pufru. Gel pro jednu elektroforetickou separaci byl připraven z 50 ml gelu, do kterého bylo po jeho rozvaření přidáno 2,5 µl fluorescenčního barviva GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium) pro následnou vizualizaci produktů. Do první jamky gelu bylo vždy napipetováno 1,5 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp DNA (Fermentas) a v dalších jamkách bylo vždy analyzováno 5 µl PCR produktu. Separace byla následně provedena při 80 V po dobu asi 45 min. Výsledky byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a dokumentačního systému Syngene (G: BOX, Syngene).

4.7 Izolace PCR produktu z gelu

PCR produkty vhodné pro sekvencování byly vyizolovány z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction kit podle modifikovaných pokynů výrobce. Postup byl proveden následovně:

1. PCR produkty byly rozděleny na 1% agarózovém gelu, při 80 V.
2. Gel byl umístěn na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu.
3. Sterilním skalpelem byl za procházejícího UV světla vyříznut PCR produkt a byl umístěn do označené a zvážené 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
4. Do zkumavky bylo přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1 (v/w).
5. Mikrozkušavky s obsahem byly inkubovány při 50°C v suché lázni (BIOER), dokud nedošlo k rozpuštění gelu.
6. Do zkumavky byl přidán jeden objem izopropanolu.
7. Směs byla promíchána a napipetována do kolonky vložené do sběrné zkumavky. Obsah byl centrifugován 1 min při 13 000 g.
8. Kapalný obsah sběrné zkumavky byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 500 µl QG pufru. Byl zopakován postup centrifugace a vylití kapaliny ve sběrné zkumavce.
9. Do kolonky bylo přidáno 750 µl PE pufru a opět byl zopakován proces centrifugace a vylití filtrátu.
10. Kolonka umístěná v prázdné sběrné zkumavce byla znovu centrifugována 1 min při 13000 g a následně umístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
11. Do kolonky bylo napipetováno 30 µl destilované vody, rozpuštěná DNA byla uvolněna do mikrozkušavky centrifugací při 13 000 g po dobu 1 min.
12. Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena fluorimetricky pomocí barviva Hoechst 33258 (Fluorimetr DynaQuant DQ 200, Amersham Biosciences).

Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C a následně použita pro přípravu vzorků na sekvencování.

4.8 Sanger sekvencování

Pro přípravu vzorků na sekvencování byla použita souprava The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher). Izolovaná DNA byla v závislosti na délce analyzovaných fragmentů naředěna následovně: pro fragmenty o velikosti cca 2000 bp bylo použito 50 ng DNA na reakci, pro fragmenty o délce cca 1800 bp bylo použito 40 ng na reakci a pro fragmenty o přibližné délce 1000 bp 25 ng DNA na reakci.

Reakční směs pro sekvenační reakci byla připravena s ohledem na množství testovaných vzorků a počtu použitých primerů, přičemž pro každý specifický primer byla připravena univerzální reakční směs (složení viz Tabulka č. 4), která byla dále rozpipetována po 4 µl do 0,2ml mikrokumavek. Do každé mikrokumavky bylo následně přidáno 6 µl DNA o koncentraci odpovídající délce sekvencovaného fragmentu.

- UP6/DW3 produkty byly sekvencovány s použitím primerů UP6, DW3, UP1, DW1 a DW6.
- UP3/6DWsp produkty byly sekvencovány s použitím primerů UP3, 6DWsp, UP2, 6UPsp, DW4, DW2a a UP2dw.
- DW2/DW9 produkty byly sekvencovány s použitím primerů DW2, DW9, UP9 a DW5.
- UP1/DW3 produkty byly sekvencovány s použitím primerů UP1 a DW3.

Veškeré kroky přípravy PCR reakční směsi byly provedeny ve sterilních podmínkách v laminárním boxu.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro přípravu vzorku na sekvencování

Položka	Objem pro 1 test [µl]
Puf	1,00
Primer	2,00
DNA	6,00
BigDye Terminator	1,00

Výsledek sekvenační reakce byl následně vyhodnocen pomocí kapilárové elektroforézy za použití genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR - Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Univerzita Palackého v Olomouci.

4.9 Bioinformatická analýza

Pro složení finálních kontigů z jednotlivých výstupů genetického analyzátoru byl použit program SeqMan (DNASTAR, Lasergene). Následným porovnáním těchto kontigů se sekvencemi poskytnutými GenBank databází a využitím programu Blast (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>) byla určena identita získaných sekvencí. Jednotlivé získané sekvence byly porovnané s odpovídajícími částmi genomů dalších zástupců rodu *Badnavirus* dostupných v databázi GenBank za účelem zjištění

jejich genetické variability. Byl proveden mnohočetný alignment pomocí programu ClustalW. Následná fylogenetická analýza byla provedena za pomoci Neighbor-joining metody, výsledné stromy byly vizualizovány za pomoci Tree Explorer, všechny algoritmy dostupné v programu MEGA v. 7.0.14.

5 Výsledky

Cílem experimentální části bakalářské práce byla analýza souboru vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.), které pocházely z oblastí jižních Čech a jižní a střední Moravy. Byl proveden skríníng přítomnosti sledovaného, dosud nepopsaného badnaviru celkem v 96 vzorcích planě rostoucího a kulturního bezu, což zahrnovalo 23 vzorků bezu pocházejících z oblastí střední Moravy, 63 vzorků bezu původem z jižní Moravy a 10 vzorků bezu z oblasti jižních Čech (Tabulka 5). Dále byl skríníng proveden v 8 rostlinách *Nicotiana occidentalis* a jedné rostlině *N. occidentalis* x *N. glutinosa*, které byly pracovníky laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, KBB PšF UP, v rámci testování mechanického přenosu viru inokulovány inokulem z infikované rostliny.

Další částí bakalářské práce bylo stanovení molekulárně genetické identity sledovaného viru a jeho následná fylogenetická analýza.

Tabulka 5: Seznam testovaných rostlin bezu a jejich původ

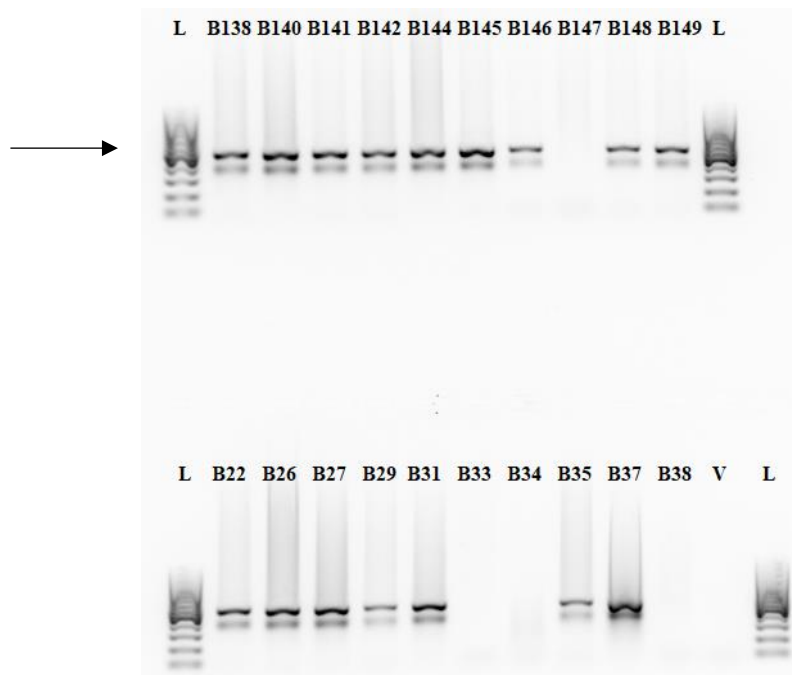
Lokalita	Počet vzorků	Počet celkem
Střední Morava		
Hněvotín, Žerůvky	2	
Náměšť na Hané	4	
Olomouc (město)	6	
Olomouc, Fort XIII	6	23
Olomouc, Hněvotín	1	
Slatinice	1	
Slatinky	3	
Jižní Morava		
Čejkovice	3	
Dolní Dunajovice	1	
Hlohovec	2	
Hustopeče (kulturní výsadba)	20	63
Hustopeče (plané)	43	
Kněžpole	1	
Milotice	2	
Rostěnice	1	
Jižní Čechy		
Rostěnice	1	
Střelské Hoštice	5	10
Veřechov	4	

5.1 Detekce sledovaného badnaviru

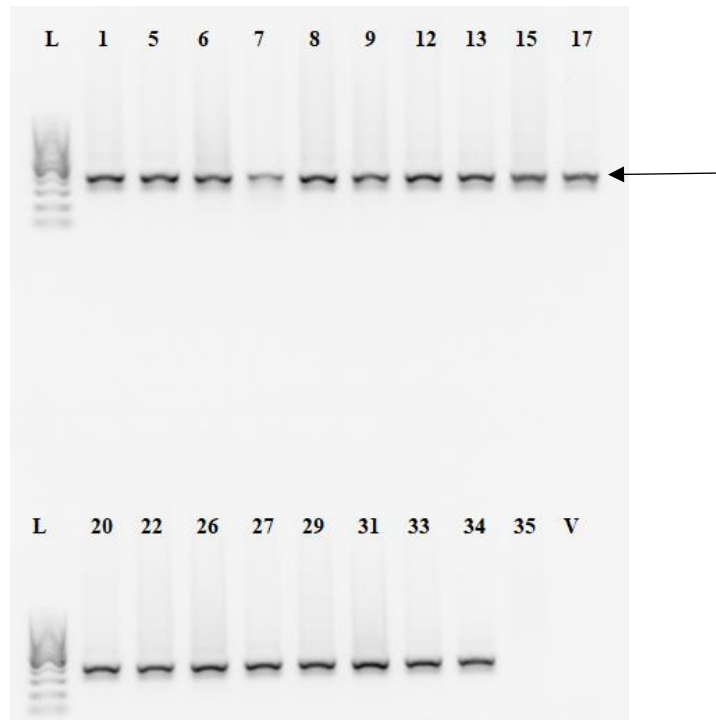
Sledovaný virus byl detekován za použití specifických primerů 5UP (f primer) a 5DW (r primer) pomocí PCR. Přítomnost tohoto viru byla potvrzena detekcí PCR produktu o velikosti cca 500 bp (očekávaná velikost 502 bp) u 75 vzorků keřů bezu z celkových 96 testovaných keřů (Obrázek 1). Virus byl detekován ve všech třech testovaných regionech, a to ve vysokých četnostech. Procentuální výskyt sledovaného viru ve vzorcích ze všech testovaných oblastí činil 78,1 %.

Přítomnost sledovaného viru byla znovu prověřena z důvodu vysokého procenta pozitivních nálezů v předchozí PCR detekci a s cílem potenciálně vyloučit možnou nespecifickou reakci použitých primerů s rostlinnou DNA. Soubor náhodně vybraných 58 vzorků, který zastupoval jak pozitivní, tak i negativní nálezy ze všech testovaných oblastí, byl tedy znovu pomocí PCR reakce otestován, tentokrát s pomocí specifických primerů 3UP/DW (Obrázek 2). Produkt o velikosti cca 400 bp (očekávaná velikost produktu 395 bp) byl detekován u 51 vzorků, zatímco u zbylých 7 nebyl produkt získán.

Obrázek 1: Detekce sledovaného viru pomocí specifických primerů 5UP a 5DW



Legenda: L - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas, B22–B149 - označení vzorků, V - negativní kontrola, šipka označuje specifický produkt (500 bp).



Obrázek 2: Detekce sledovaného viru pomocí specifických primerů 3UP a 3DW

Legenda: L - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas, 1–35 - označení vzorků, V - negativní kontrola, šipka označuje specifický produkt (400 bp).

Výskyt sledovaného badnaviru v jižních Čechách

Pro testování přítomnosti sledovaného viru bylo z oblasti jižních Čech vybráno 10 rostlin (Tabulka 6). Mezi pozorovatelné symptomy na rostlinách patřila chlorotická mozaika a svráštělé listy, 5 rostlin bylo bezpříznakových. Záchyt sledovaného viru činil 60 %.

Amplikon byl po provedení PCR reakce za použití páru primerů 5UP/5DW získán v případě 6 rostlin, konkrétně vzorcích B73, B74, B75, B76, B78 a B81. Rostliny B73 a B76 byly vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost sledovaného viru i přes to, že na těchto rostlinách nebyly pozorovány žádné příznaky virové infekce. Při opětovném testování všech vzorků z této oblasti, tentokrát za použití 3UP/DW při PCR reakci, bylo dosaženo stejného výsledku ve všech případech až na jeden. Vzorek B80 byl v případě použití prvního páru primerů shledán jako negativní, v případě použití páru druhého byl detekován očekávaný produkt.

Tabulka 6: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Čechy

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy	Lokalita
	5UP/DW	3UP/DW		
B72	-	-	bez symptomů	Střelské Hoštice
B73	+	+	bez symptomů	Rostěnice
B74	+	+	svraštělé listy	Střelské Hoštice
B75	+	+	chlorotická mozaika	Veřechov
B76	+	+	bez symptomů	Střelské Hoštice
B77	-	-	bez symptomů	Střelské Hoštice
B78	+	+	svraštělé listy	Střelské Hoštice
B79	-	-	bez symptomů	Veřechov
B80	-	+	chlorotická mozaika	Veřechov
B81	+	+	svraštělé listy	Veřechov

Legenda: (+) - pozitivní nález; (-) - negativní nález.

Výskyt sledovaného badnaviru na střední Moravě

Přítomnost viru v keřích bezu černého rostoucích v oblasti střední Moravy byla prověřena celkem ve 23 rostlinách (Tabulka 7). Keře, ze kterých byly odebrány listy pro testování, jevíly známky virové infekce jako chlorózy, chlorotické mozaiky a chlorotické prstence na listech, nekrózy, zakrslosti listů, stáčení listů nebo neuniformní dozrávání plodů. Dále byly vzorky odebrány i z rostlin, které sice nejevily žádné symptomy virové infekce, ale nacházely se v blízkosti symptomatických rostlin. Virus byl detekován v 82,6 %.

Virus nebyl za použití primerů 5UP a 5DW detekován pouze ve třech případech: v rostlině B7 i přes to, že na jejích listech byla pozorovatelná chlorotická mozaika, dále v rostlině B261, která jevíla známky chlorózy a zakrslosti listů, v asymptomatické rostlině B13 a rostlině B189. Všechny zbylé rostliny jevíly známky virové infekce a přítomnost sledovaného viru u nich byla potvrzena. Pro detekci viru druhým párem specifických primerů (3UP a 3DW) bylo náhodně vybráno 19 vzorků, u kterých byla přítomnost viru pomocí PCR reakce potvrzena ve všech rostlinách. Produkt byl získán i v případě tří keřů, vzorků B7, B13 a B189, u kterých nebyl virus s použitím primerů 5UP a 5DW detekován.

Tabulka 7: Detekce viru v rostlinách bezu, střední Morava

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy	Lokalita
	5UP/DW	3UP/DW		
B1	+	+	chloróza, stáčení listů	Olomouc, Hněvotín
B5	+	+	chloróza	Olomouc, Fort XIII
B6	+	+	bez symptomů	Olomouc, Fort XIII
B7	-	+	chlorotická mozaika	Olomouc, Fort XIII
B8	+	+	chloróza, malé listy	Hněvotín, Žerůvky
B9	+	+	chloróza, malé listy	Hněvotín, Žerůvky
B12	+	+	chloróza	Slatinky
B13	-	+	bez symptomů	Slatinky
B15	+	+	chloróza, nerovnoměrně dozrálé plody	Slatinky
B17	+	+	bez symptomů	Slatinice
B20	+	+	chlorotické prstence	Náměšť na Hané
B22	+	+	chlorotické prstence	Náměšť na Hané
B26	+	+	chlorotické prstence	Náměšť na Hané
B27	+	+	chlorotické prstence	Náměšť na Hané
B41	+	+	chloróza	Olomouc
B42	+	nt	bez příznaků	Olomouc
B42-2018	+	+	mozaika, malé listy, nekróza	Olomouc
B189	-	+	nh	Olomouc
B192	+	+	nh	Olomouc
B259	+	+	chloróza, malé listy, nerovnoměrně dozrálé plody	Olomouc, Fort XIII
B260	+	nt	chloróza, malé listy	Olomouc, Fort XIII
B261	-	nt	chloróza, malé listy	Olomouc, Fort XIII
KOJ	+	nt	chloróza, malé listy	Olomouc

Legenda: (+) - pozitivní nález; (-) - negativní nález, nh - nehodnoceno, nt - netestováno, B42-2018 - řízek z původní rostliny B42.

Výskyt sledovaného badnaviru na jižní Moravě

Celkem 63 vzorků rostlin bezu černého bylo odebráno v oblasti jižní Moravy. Pro testování přítomnosti sledovaného viru bylo vybráno 20 rostlin z kulturního sadu, které jevíly příznaky virové infekce jako malolistost, chlorózy na listech, žloutnutí listů a zasychání, nebo byly bezpříznakové. Dále byly pro analýzu vybrány plané rostliny vyskytující se v okolí tohoto sadu. Vzorky byly odebrány z rostlin, na kterých byly pozorovatelné chlorózy, chlorotické prstence, slabé mozaiky u mladých listů, difúzní mozaika, prosvětlování žilek, deformace listů, svaštění listů, zakrslost listů, svinuté listy, žluté listy,

kadeřavost, bílé okraje listů, malé květy, zavadnutí rostliny, menší vzrůst nebo zasychání celé rostliny, a z bezpříznakových rostlin v blízkosti symptomatických keřů.

Ze souboru 43 planě rostoucích rostlin bezu bylo 86 % z nich vyhodnoceno jako pozitivní na přítomnost sledovaného viru, na základě detekce produktu při použití primerů 5UP a 5DW (Tabulka 8). Většina pozitivně vyhodnocených stromů jevila známky virové infekce, nicméně přítomnost viru byla potvrzena i v několika asymptomatických rostlinách, konkrétně ve vzorcích B39, B40, B150-2018, B151-2018, B158-2018 a B161-2018. Veškeré vzorky, u kterých nebyla přítomnost viru potvrzena, taktéž jevily známky virové infekce. Při opakované PCR reakci s druhým párem primerů (3UP/DW), pro kterou bylo náhodně vybráno 10 rostlin, bylo u několika vzorků dosaženo odlišných výsledků. Konkrétně v případě vzorků B33, B34 a B38, u kterých byl tentokrát získán produkt, a v případě vzorku B35, u kterého přítomnost viru potvrzena nebyla.

Pro určení četností sledovaného viru v kulturním sadu v Hustopečích bylo vybráno 20 rostlin (Tabulka 9), z nichž rostliny B74-2018, B79-2018, B84-2018, B89-2018, B103-2018, B108-2018 a B128-2018 nejevily žádné znaky virové infekce. Přítomnost viru byla pomocí PCR reakce za použití specifických primerů 5UP a 5DW prokázána ve 13 případech (65 %) zahrnujících i asymptomatické rostliny B74-2018, B79-2018, B84-2018, B103-2018, B108-2018 a B128-2018. Virus nebyl detekován v případě vzorků rostlin B76-2018, B81-2018, B90-2018, B95-2018, B118-2018 a B127-2018, které ale jevily příznaky infekce virem, a asymptomatické rostliny B89-2018. Z vybraného souboru kulturních rostlin bezu bylo následně náhodně určeno 19 vzorků, které byly znovu podrobeny PCR reakci, tentokrát ale s párem specifických primerů 3UP a 3DW. Výsledky se však v případě vzorků B81-2018, B89-2018, B90-2018 a B95-2018 lišily.

Tabulka 8: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Morava

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy	Lokalita
	5UP/DW	3UP/DW		
B29	+	+	chlorotické prstence	Rostěnice
B31	+	+	chloróza, malé listy	Milotice
B33	-	+	zmlazující, mozaika u mladých listů	Milotice
B34	-	+	prosvětlené žilky	Čejkovice
B35	+	-	zmlazující keř, mozaika	Čejkovice
B37	+	+	deformace listů	Čejkovice
B38	-	+	deformace listů, mladé výhony	Hlohovec
B39	+	+	bez symptomů	Hlohovec
B40	+	+	bez symptomů	Dolní Dunajovice
B70-2018	+	nt	slabá chloróza	Hustopeče
B71-2018	+	nt	slabá chloróza	Hustopeče
B72-2018	+	nt	slabá chloróza, mírné svrštění listů	Hustopeče
B102-2018	+	+	malé listy	Hustopeče
B131-2018	+	nt	bez symptomů	Hustopeče
B132-2018	+	nt	mozaika, bílé okraje listů	Hustopeče
B133-2018	+	nt	kombinace příznaků	Hustopeče
B134-2018	-	nt	prosychá	Hustopeče
B135-2018	+	nt	chlorózy, mozaika, kroužky	Hustopeče
B137-2018	+	nt	mozaika, kroužky, chloróza	Hustopeče
B138-2018	+	nt	mozaika, kroužky	Hustopeče
B140-2018	+	nt	chloróza, svrasklé listy	Hustopeče
B141-2018	+	nt	mírná mozaika	Hustopeče
B142-2018	+	nt	chlorózy, kroužky, malé listy	Hustopeče
B144-2018	+	nt	mozaiky, prosvětlení žilek	Hustopeče
B145-2018	+	nt	chloróza	Hustopeče
B146-2018	+	nt	chloróza, prosvětlení žilek	Hustopeče
B147-2018	-	nt	chloróza	Hustopeče
B148-2018	+	nt	chloróza, deformace listů	Hustopeče
B149-2018	+	nt	mozaiky na listech	Hustopeče
B150-2018	+	nt	bez symptomů	Hustopeče

Legenda: (+) - pozitivní nález, (-) - negativní nález, nt - netestováno.

Tabulka 9: Detekce viru v rostlinách bezu, jižní Morava (pokračování)

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy	Lokalita
	5UP/DW	3UP/DW		
B151-2018	+	nt	bez symptomů	Hustopeče
B152-2018	-	nt	chloróza, svinutka	Hustopeče
B153-2018	+	nt	světle zelený keř, našedlé listy	Hustopeče
B154-2018	+	nt	prosychá keř, houba	Hustopeče
B155-2018	+	nt	prosychá keř, malé listy	Hustopeče
B156-2018	+	nt	difúzní mozaika	Hustopeče
B158-2018	+	nt	bez symptomů	Hustopeče
B161-2018	+	nt	bez symptomů	Hustopeče
B168-2018	+	nt	prosychá, chlorózy, malé listy	Hustopeče
B169-2018	+	nt	mladý strom, chlorózy	Hustopeče
B172-2018	+	nt	prosychá, chlorózy, malé listy	Hustopeče
B177-2018	+	nt	prosychá, chlorózy, malé listy	Hustopeče
B300	+	nt	chloróza, zmenšené listy	Kněžpole

Legenda: (+) - pozitivní nález; (-) - negativní nález, nt - netestováno.

Tabulka 10: Detekce viru v kulturních rostlinách bezu, cv. Dana a Bohatka

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy
	5UP/DW	3UP/DW	
73-2018	+	nt	menší listy
74-2018	+	-	zdravý
76-2018	-	+	chloróza, mozaiky, žilky
79-2018	+	+	zdravý
81-2018	-	+	slabá chloróza
83-2018	+	+	chloróza, zavadlá rostlina
84-2018	+	+	zdravý
89-2018	-	+	zdravý
90-2018	-	+	malé květy, slabší vzrůst
91-2018	+	+	svinuté malé listy, zavadá
95-2018	-	+	strom zasychá, mrtvé dřevo, chlorózy

Legenda: (+) - pozitivní nález; (-) - negativní nález, nt - netestováno.

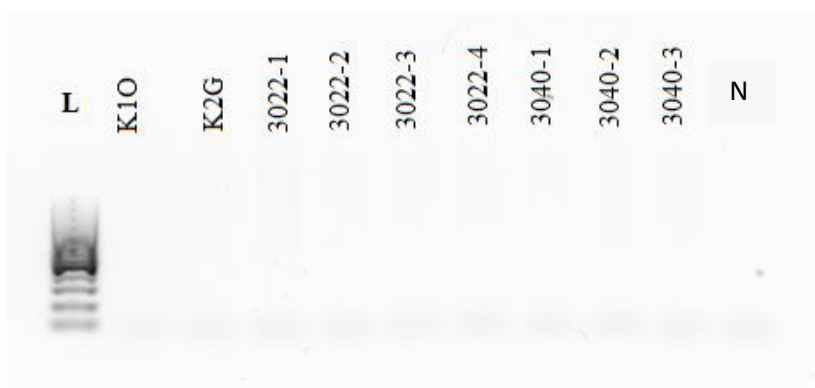
Tabulka 11: Detekce viru v kulturních rostlinách bezu, cv. Dana a Bohatka (pokračování)

Vzorek	PCR detekce primery		Symptomy
	5UP/DW	3UP/DW	
98-2018	+	+	difúzní mozaiky, špatný stav
99-2018	+	+	difúzní mozaiky, špatný stav
103-2018	+	+	zdravý
108-2018	+	+	zdravý
109-2018	+	+	žlutý, difúzní mozaika
116-2018	+	+	svinutka, žlutý, malolistost
118-2018	-	-	svinutka, žlutý, malolistost
127-2018	-	-	obrost, kadeřavost
128-2018	+	+	zdravý

Legenda: (+) - pozitivní nález; (-) - negativní nález, nt - netestováno.

V rámci experimentální práce byla dále ověřena úspěšnost mechanického přenosu sledovaného viru na experimentální bylinné hostitele. Pomocí PCR analýzy za použití specifických primerů 5UP/5DW byla zjišťována přítomnost viru v rostlinách tabáku, které byly inokulovány inokulem získaným z infikované rostliny B13. Celkem bylo otestováno 8 rostlin *N. occidentalis* a jedna rostlina *N. occidentalis* x *N. glutinosa*, které jevíly symptomy, chlorózy a prosvětlování žilek, podobné virové infekci. V žádném z testovaných vzorků nebyl získán očekávaný produkt, a experimentální mechanický přenos se tedy nezdařil (Obrázek 3).

Obrázek 3: Detekce sledovaného viru pomocí primerů 5UP a 5DW v inokulovaných rostlinách



Legenda: L - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas; K10, K2G, 3022-1, 3022-2, 3022-3, 3022-4, 3040-1, 3040-2, 3040-3 - označení vzorků, N - negativní kontrola.

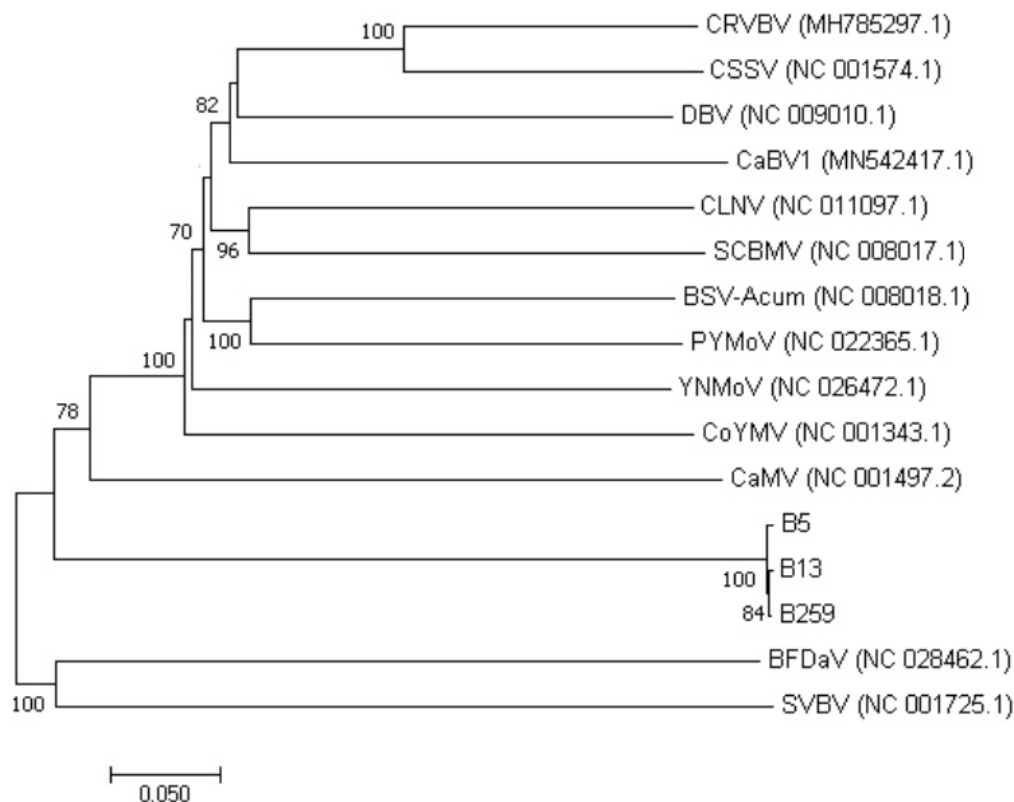
5.2 Genetická analýza detekovaného viru

U vybraných tří izolátů byla provedena amplifikace dvou oblastí genomu a byly získány sekvence amplifikované pomocí primerů UP6, UP3, DW2, UP1, DW3, DW6sp a DW9. Parciální sekvence ORF3 vzorků B5, B13 a B259 byla získána amplifikací pomocí specifických primerů UP1, DW1, UP3, DW3 a DW4, zatímco sekvence ORF5 pomocí primerů DW6sp, UP6sp, DW2 a DW2a, o délce 1100–2766 bází.

BlastN (Blastx) analýza potvrdila, že se jedná o oblasti ORF5 a parciální sekvence ORF3 odpovídající těmto ORF jiných badnavirů dostupných v databázi GenBank.

Parciální aminokyselinová sekvence ORF3 vykazovala identitu se sekvencemi hypotetického proteinu (Acc. No. NP043932.1) a plášťového proteinu (Acc. No. AMB57362.1) strawberry vein banding virus (SVBV), nacházejícími se v oblasti ORFIV, s identitou 28 %; sekvencí polyproteinu blueberry fruit drop associated virus (BFDAV) (Acc. No. YP009182100.1) s identitou 27–28 %; sekvencí plášťového proteinu (Acc. No. AHA91330.1) a kapsidového proteinu (Acc. No. BAO53574.1) cauliflower mosaic virus (CaMV), nacházející se v oblasti ORF IV, s identitou 25–26 %. Zároveň tato sekvence ale vykazovala nejvyšší identitu (29 %) s necharakterizovaným proteinem *Chenopodium quinoa* o neznámé funkci (Acc. No. XP021743973.1).

Na základě podobností získaných sekvencí parciálního ORF3 s některými dalšími zástupci čeledi *Caulimoviridae* byla provedena fylogenetická analýza (Obrázek 4). Pomocí metody neighbor-joining byly porovnány fylogenetické vztahy, které byly vyjádřeny pomocí nezakořeněného fylogenetického stromu. Parciální sekvence ORF3 izolátů z bezu tvořily samostatnou signifikantní větev, odlišnou od ostatních badnavirů.



Obrázek 4: Fylogenetická analýza získané parciální sekvence ORF3 izolátů B5, B13 a B259

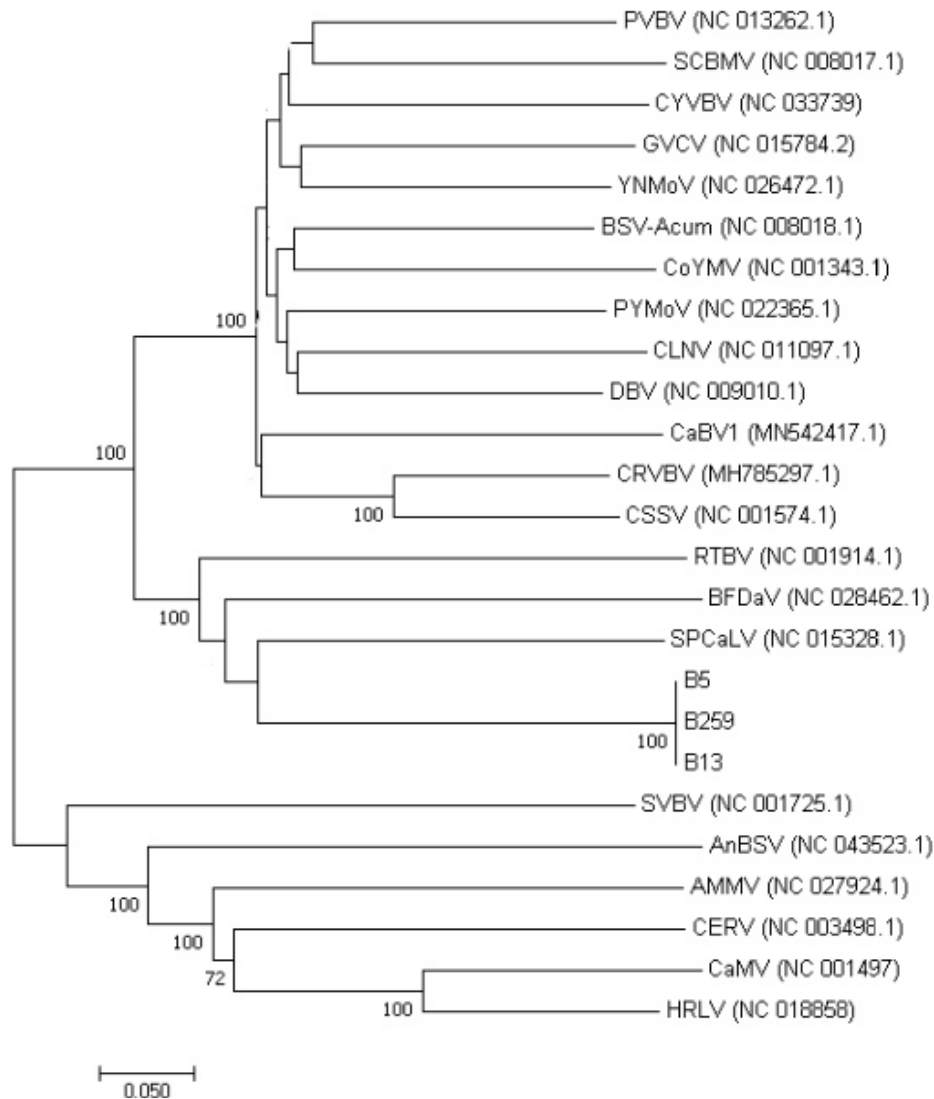
Legenda: CRVBV - Cacao red vein-banding virus; CSSV - Cacao swollen shoot virus; DBV - Dioscorea bacilliform virus; CaBV1 - Camellia badnavirus 1; CLNV - Cycad leaf necrosis virus; SCBMV - Sugarcane bacilliform Mor virus; BSV-Acum - Banana streak virus Acuminata Yunnan; PYMoV - Piper yellow mottle virus; YNMoV - Yacon necrotic mottle virus; CoYMV - Commelina yellow mottle virus; CaMV - Cauliflower mosaic virus; BFDaV - Blueberry fruit drop associated virus; SVBV - Strawberry vein banding virus.

Aminokyselinová sekvence ORF5 virových izolátů vykazovaly částečnou identitu s různými oblastmi genomu řady rostlinných virů čeledi *Caulimoviridae*. Mezi podobné aminokyselinové sekvence náležely: s identitou 52-54 % sekvence ORF3 strawberry vein-banding virus (Acc. No. NP 043933.1); s identitou 48-50 % sekvence ORF5 atractylodes mild mottle virus (Acc. No. YP 009165750.1) a sweet potato caulimo-like virus (Acc. No. ADZ 45038.1), a sekvence kódující polyprotein blueberry fruit drop associated virus (Acc. No. YP 009182100.1); s identitou 47-48% sekvence ORFY rice tungro bacilliform virus (Acc. No. FAA 01208.1), ORF3 cacao yellow vein banding virus (Acc. No. YP 009345075.1), ORF3 grapevine vein clearing virus (Acc. No. AM 62341.1), ORF3 pagoda yellow mosaic associated virus (Acc. No. YP 009041481.1) a sekvence hypotetického proteinu pelargonium vein banding virus (Acc. No. YP 003208050.1); s identitou 45-46 % sekvence ORF5 cauliflower mosaic virus (Acc. No. BAO 53393.1), ORF5 angelica bushy stunt virus (Acc. No. YP 009666503.1), ORF5 horseradish latent virus (Acc. No. YP 006907836.1) a sekvence ORF4 dioscorea bacilliform virus (Acc. No. ABI 47987.1); s identitou 44 % sekvence kódující protein carnation etched ring virus (Acc. No.

CAH 68829.1). Zároveň ale tyto sekvence vykazovaly částečnou identitu (52–53 %) se sekvencí retrotranspozonu rýže seté (*Oryza sativa*) (Acc. No. AAP 53052.1) a sekvencí necharakterizovaného proteinu rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) (Acc. No. XP 025888337.1) s identitou 49–51 %.

Na základě identity mezi získanými sekvencemi ORF5 a sekvencemi dalších virů čeledi *Caulimoviridae* byla provedena fylogenetická analýza sledovaného viru (Obrázek 5). Získané sekvence ORF5 původem ze vzorků B5, B13 a B259 byly, podle fylogenetického stromu vygenerovaného pomocí neighbor-joining metody, evolučně nejbližší se sekvencí sweet potato caulimo like virus (*Cavemovirus*, *Caulimoviridae*), blueberry fruit drop associated virus (*Vaccinivirus*, *Caulimoviridae*) a rice tungro bacilliform virus (*Tungrovirus*, *Caulimoviridae*).

Obrázek 5: Phylogenetická analýza získané sekvence ORF5 izolátů B5, B13 a B259



Legenda: PVBV - Pelargonium vein banding virus; SCBMV - Sugarcane bacilliform Mor virus; CYVBV - Cacao yellow vein banding virus; GVCV - Grapevine vein clearing virus; YNMoV - Yacon necrotic mottle virus; BSV-Acum - Banana streak virus Acuminata Yunnan; CoYMV - Commelina yellow mottle virus; PYMoV - Piper yellow mottle virus; CLNV - Cycad leaf necrosis virus; DBV - Dioscorea bacilliform virus; CaBV1 - Camellia badnavirus 1; CRVBR - Cacao red vein-banding virus; CSSV - Cacao swollen shoot virus; RTBV - Rice tungro bacilliform virus; BFDaV - Blueberry fruit drop associated virus; SPCa-LV - Sweet potato caulimo-like virus; SVBV - Strawberry vein banding virus; AnBSV - Angelica bushy stunt virus; AMMV-ES - Atractylodes mild mottle virus; CERV - Carnation etched ring virus; CaMV - Cauliflower mosaic virus; HRLV - Horseradish latent virus.

6 Diskuze

Badnaviry se převážně vyskytují v subtropických a tropických oblastech, kde představují velkou ekonomickou hrozbu, jelikož dochází ke snížení výnosu rostlin infikovaných těmito virem (Hull, 1996; Dahal *et al.*, 2000; Daniells *et al.*, 2001; Adejumo, 2005;). V posledních letech však dochází k detekci badnavirů i v oblastech mírného pásma (Kalischuk *et al.*, 2008; Fránová a Jakešová, 2012; Rumbou *et al.*, 2018). Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na detekci dosud nepopsaného badnaviru infikujícího bez černý (*Sambucus nigra* L) v České republice. Jediným dalším badnavirem popsáným a vyskytujícím se v České republice je RCBV (Fránová a Jakešová, 2002).

Při skríningu výskytu sledovaného viru byly použity dva páry specifických detekčních primerů (3UP/3DW a 5UP/5DW), výsledky ale v mnoha případech nebyly jednotné. Tyto rozdílné výsledky mohou ukazovat na nespolehlivost prvního páru primerů, jelikož nedošlo k amplifikaci virové DNA i přes to, že testované rostliny vykazovaly symptomy podobné infekci sledovaným virem. Pozorované symptomy ale nemusí být specifické a mohly být vyvolány jiným rostlinným virem.

Třináct planých rostlin (B6, B13, B17, B39, B40, B42, B73, B76, B131-2018, B150-2018, B151-2018, B158-2018 a B161-2018) bylo asymptomatických, a přesto u nich byla vždy za použití alespoň jednoho páru primerů prokázána přítomnost sledovaného viru. V rámci detekce sledovaného viru byl také analyzován soubor dvaceti vzorků rostlin bezu pocházejících z kulturního sadu v Hustopečích. V okolí kulturního sadu se vyskytovalo množství rostlin, u kterých byla přítomnost viru potvrzena, je proto pravděpodobné, že došlo k přenosu sledovaného viru z těchto planých rostlin i na rostliny kulturní. Jakým způsobem se sledovaný badnavirus přenáší, však zatím není známo. Mezi způsoby přenosu u popsáných badnavirů patří přenos vegetativní propagací, přenos semeny, nebo živočišným vektorem (mšice, vlnatky) (Adams *et al.*, 1987; Lockhart *et al.*, 1997; Macanawai *et al.*, 2005; Quainoo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Deeshma a Bhat, 2017; Rumbou *et al.*, 2018), a proto je pravděpodobné, že k jeho přenosu do kulturního sadu došlo infikovanými mšicemi. Vysoká četnost detekovaného viru je dosti překvapivá, i přes to, že byly do souboru rostlin vybírány potenciálně infikované rostliny. Badnaviry se ale mohou v rostlině vyskytovat v tzv. endogenní formě, kdy je jejich nukleová kyselina začleněna do genomu hostitelské rostliny. V takovém případě dochází k projevům virové infekce pouze v případě, že je infikovaná rostlina vystavena stresovým podmínkám (Lheureux *et al.*, 2003; Chabannes *et al.*, 2013). V úvahu je však také nutné brát možnost falešně pozitivního nálezu způsobeného interferencí primerů s rostlinnou DNA nebo detekci nefunkčních částí genomu badnaviru začleněného do genomu rostliny v rámci její evoluce.

Experiment za účelem otestovat úspěšnost mechanického přenosu sledovaného viru prokázal, že tento virus není mechanicky přenosný na rostliny *N. occidentalis* a *N. occidentalis* x *N. glutinosa*, na rozdíl od dalších zástupců badnavirů, u kterých byl experimentální přenos proveden úspěšně (Silva *et al.*,

2002). Pro jasné potvrzení, že virus není mechanicky přenosný, by však bylo třeba provést experimentální přenos na širší okruh indikátorových rostlin a použít jejich větší počet.

Analýzou získaných sekvencí pomocí programu BLAST bylo zjištěno, že studovaný virus vykazuje identitu se sekvencemi ORF3 a ORF5 virů náležících do čeledi *Caulimoviridae*. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo najít sekvenci, která by vykazovala vyšší identitu se získanými sekvencemi, můžeme sledovaný virus považovat za dosud neznámého zástupce rodu *Badnavirus*. Získané předpokládané ORF3 sekvence bezových izolátů se z 29 % shodují se sekvencí kódující hypotetický protein merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*) (Acc. No. XP021743973.1). Tato identita dokazuje schopnost badnavirů integrovat svojí DNA do genomu hostitelské rostliny procesem rekombinace a vyskytovat se tak i v endogenní formě, jako tomu je například u BSOLV (*Banana streak OL virus*, BSGF (*Banana streak GF virus*) a BSIMV (*Banana streak IM virus*) (Chabannes *et al.*, 2013). Tato skutečnost je také podporována přítomností shody s hypotetickými proteinovými sekvencemi rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) (XP 025888337.1) a rýže seté (*Oryza sativa*) (AAP 53052.1) v případě ORF5 sledovaného viru. Schopnosti integrace DNA sledovaného viru do genomu hostitelské rostliny nasvědčuje fakt, že se pomocí sekvenování podařilo získat pouze částečné fragmenty virového genomu, nikoliv celou kruhovou molekulu.

Fylogenetický strom, sestrojený pomocí neighbor-joining metody, prokázal, že získané sekvence tvoří samostatnou skupinu, a tedy potenciální nový druh rodu *Badnavirus*. Pro získání přesnějších informací o identitě sledovaného viru by bylo třeba provést fylogenetickou analýzu jeho celého genomu, jehož sekvenci se ale v rámci této bakalářské práce nepodařilo získat.

7 Závěr

V rámci této bakalářské práce byl testován soubor vzorků bezu černého (*Sambucus nigra* L.) na přítomnost dosud nepopsaného viru rodu *Badnavirus* (čeleď *Caulimoviridae*). Skrining tohoto viru byl proveden celkem v 96 vzorcích planě rostoucích a kulturních rostlin původem z jižních Čech a jižní a střední Moravy. Pro detekci sledovaného viru byly navrženy dvě kombinace specifických primerů (5UP/5DW a 3UP/3DW), z nichž byla jako spolehlivější vyhodnocena kombinace primerů 3UP/3DW. Sledovaný virus byl detekován ve vzorcích ze všech testovaných oblastí, a to s vysokým procentem výskytu - 60–82,6 %.

Sekvencováním získaných částí virové DNA původem z rostlin B5, B13 a B259 byly získány parciální sekvence ORF3 o délce 2 745–2 766 bp a sekvence ORF5 o délce 1 100–1 330 bp sledovaného viru. Sekvence virových izolátů vykazovaly nejvyšší identitu se zástupci rostlinných virů strawberry vein banding virus, blueberry fruit drop associated virus, cauliflower mosaic virus a sweet potato caulimovirus (čeleď *Caulimoviridae*). Následnou fylogenetickou analýzou pomocí neighbor-joining metody bylo prokázáno, že studovaný virus tvoří v rámci badnavirů a čeledi *Caulimoviridae* samostatnou skupinu, což nasvědčuje tomu, že se s vysokou pravděpodobností jedná o nový virus.

BLAST analýza získaných sekvencí bezových izolátů prokázala výskyt podobných sekvencí v genomu merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*), rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) a rýže seté (*Oryza sativa*). S ohledem na vysoký záchyt virových sekvencí v rostlinách bezu původem z různých regionů České republiky, společně se schopností badnavirů začleňovat se do genomu hostitele, nelze bez získání kompletní sekvence nového viru vyloučit výskyt tohoto badnaviru v endogenní formě.

8 Literatura

- Abrokwah F., Dzahini-Obiatey H., Galyuon I., Osae-Awuku F., Muller E (2016): Geographical distribution of cacao swollen shoot virus molecular variability in Ghana. *Plant Disease* 100:2011–2017.
- Adams A. N., Posnette A. F. (1987): Molecular analyses of the complete genomic sequences of four isolates of *Gooseberry vein binding associated virus*. In: Converse R. H. (ed): *Virus diseases of small fruits*, pp. 129-130, U. S. Dept. Of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D. C. In: Xu D., Mock R., Kinard G., Li R. (2011): *Virus genes* 43: 130–137.
- Adejumo T. O. (2005): Crop protection strategies for major diseases of cocoa, coffee and cashew in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 4: 143–150.
- Anno-Nyako F. O. (1986): Semipersistent transmission of an „extra mild“ isolate of *Cowpea mild mottle virus* on soya bean by the white fly *Bemisia tabaci* Genn. In Nigeria. *Tropical Agriculture (Trinidad and Tobago)* 63(3): 193–194.
- Berniak H. (2016): Partial characterization of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) isolates infecting *Sambucus* spp. plants in Poland. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 15(2): 55–63.
- Bhat A.I., Hohn T., Selvarajan R. (2016): Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses* 8(6). pii: E177.
- Bhat A. I., Devasahayam S., Sarma Y. R., Pant R. P. (2003): Association of a badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Current science* 84(12): 1547–1550.
- Borah B. K., Johnson A. M. A., Gopal D. V. R. S., Dasgupta I. (2009): Sequencing and computational analysis of complete genome sequences of *Citrus yellow mosaic badna virus* from acid lime and pummelo. *Virus Genes* 39: 137–140.
- Borah B. K., Sharma S., Kant R., Johnson A. M. A., Saigopal D. V. R., Dasgupta I. (2013): Bacilliform DNA-containing plant viruses in the tropics: commonalities within a genetically diverse group. *Molecular Plant Pathology* 14(8): 759–771.
- Brčák J. (1964): A virus disease of *Sambucus nigra* resembling infection by *Arabis mosaic virus*. In: *Plant Virology Proceedings of the 5th Conference of the Czechoslovak Plant Virologist, 1962, Praha*, pp. 280.
- Bridson R. W., Phillips S., Brunt A., Hull R. (1999): Analysis of the sequence of *Discorea alata bacilliform virus*; Comparison to other members of the badnavirus group. *Virus Genes* 18: 277–283.
- Chabannes M., Baurens F., Duroy P., Bocs S., Vernerey M., Rodier-Goud M., Barbe V., Gayral P., Iskra-Caruana M. (2013): Three Infectious Viral Species Lying in Wait in the Banana Genome. *Journal of Virology* 87(15): 8624–8637.

- Cheng C., Lockhart B. E. L., Olszewski N. E. (1996): The ORF I and II Proteins of Commelina Yellow mottle virus are virion-associated. *Virology* 223, pp. 263–271.
- Cheng C., Tzafrir I., Lockhart B. E. L., Olszewski N. E. (1998): Tubules containing virions are present in plant tissues infected with *Commelina yellow mottle badnavirus*. *Journal of General Virology* 79: 925–929.
- Dahal G., Paasberg-Gauhl C., Gauhl F., Thottappilly G., Hughes J. d'A. (1998): Studies on Nigerian isolate of banana streak badnavirus: II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. *Annals of Applied Biology* 132(2): 263–275.
- Dahal G., Ortiz R., Tenkouano A., Hughes J. D. A., Thottappilly G., Vuylsteke D., Lockhart B. E. L. (2000): Relationship between natural occurrence of banana streak badnavirus and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. *Plant Pathology* 49: 68–79.
- Daniells J. W., Geering A. D. W., Bryde N. J., Thomas J. E. (2001): The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert banana in tropical Australia. *Annals of Applied Biology* 139: 51–60.
- Dean F. B., Nelson J. R., Giesler T. L., Lasken R. S. (2001): Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research* 11: 1095–1099.
- Deeshma K. P. a Bhat A. I. (2014): Further evidence of true seed transmission of *Piper yellow mottle virus* in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 42: 289–293.
- Ellis P. J., Stace-Smith R., Converse R. H. (1992): Isolation and some properties of North American carlavirus in *Sambucus racemosa*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 308: 113–120.
- Fránová J. a Jakešová H. (2012): First report of bacilliform Badnavirus-like virus particles in red clover. *Journal of Phytopathology* 160(10): 588–590.
- Frischina A., Chappetta L., Jacquemond M., Tepfer M. (2017): Infection of non-host model plant species with the narrow-host-range *Cacao swollen shoot virus*. *Molecular Plant Pathology* 18(2): 293–297
- Gaddam S. A., Kotakadi V. S., Reddy M. N., Saigopal D. V. R. (2012): Antigenic relationships of citrus yellow mosaic virus by immunological methods. *Asian Journal of Plant Science and Research* 2(5): 566–569.
- Geering A. D., McMichael L. A., Dietzgen R. G., Thomas J. E. (2000): Genetic diversity among banana streak virus isolates from Australia. *Phytopathology* 90, pp. 921–927.
- Geering A. D. W., Pooggin M. M., Olszewski N. E., Lockhart B. E. L., Thomas J. E. (2005): Characterisation of banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. *Archives of Virology* 150: 787–796.

- Geering A. D. W., Maumus F., Copetti D., Choisine N., Zwickl D. J., Zytnicki M., McTaggart A. R., Scalabrin S., Vezzulli S., Wing R. A., Quesneville H., Teycheney P. (2014): Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and hallmarks of virus evolution. *Nature Communications*; Vol. 5, pp. 5269.
- Hagen L. S., Jacquemond M., Lepingle A., Lot H., Tepfer M. (1993): Nucleotide sequence and genomic organization of *Cacao swollen shoot virus*. *Virology* 196(2): 619–628.
- Hansen A. J., Nyland G., McLeroy F., Stace-Smith R. (1974): Origin, cause, host range and spread of cherry rasp leaf disease in North America. *Phytopathology* 64: 721–727.
- Hansen A. J., Stace-Smith R. (1971): Determination of a virus in golden elderberry. In: *Proceedings for the 8th European Symposium of Fruit tree Virus Diseases, 1971, Bordeaux, France*, pp.147.
- Hany U., Adams I. P., Glover R., Bhat A. I., Boonha, N. (2014): The complete genome sequence of *Piper yellow mottle virus* (PYMoV). *Archives of virology* 159: 385–388.
- Hareesh P. S., Bhat A. I. (2010): Seed transmission of *Piper yellow mottle virus* in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 38: 62–65.
- Ho T., Quito-Avila D., Keller K. E., Postman J. D., Martin R. R., Tzanetakis I. E. (2016): Evidence of sympatric speciation of elderberry carlaviruses. *Virus Research* 215: 72–75.
- Hull R. (1996): Molecular biology of *Rice tungro viruses*. *Annual Review of Phytopathology* 34: 275–297.
- Jacquot E., Hagen L. S., Jacquemond M., Yot P. (1996): The open reading frame 2 product of cacao swollen shoot badnavirus is a nucleic acid-binding protein. *Virology* 225: 191–195.
- James A. P., Geijskes R. J., Dale J. L., Harding R. M. (2011): Development of a novel rolling-circle amplification technique to detect *Banana streak virus* that also discriminates between integrated and episomal virus sequences. *Plant Disease* 95: 57–62.
- Johne R., Müller H., Rector A., van Ranst M., Stevens H. (2009): Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends of Microbiology* 17: 205–211.
- Jones A. (1972): Purification and properties of *Elderberry latent virus*: one of four sap-transmissible viruses obtained from American elder (*Sambucus canadensis* L.). *Annals of Applied Biology* 70: 49–58.
- Jones T., McGavin W. J., Geering A. D. W., Lockhart B. E. L. (2002): Identification of *Rubus yellow net virus* as a distinct badnavirus and its detection by PCR in *Rubus* species and in aphids. *Annals of Applied Biology* 141: 1–10.
- Kalischuk M. L., Kawchuk L. M. a Leggett F. (2008): First Report of *Rubus yellow net virus* on *Rubus idaeus* in Alberta, Canada. *Plant Disease* 92(6): 974.
- Kalischuk M. L., Fusaro A. F., Waterhouse P. M., Pappu H. R., Kawchuk L. M. (2013): Complete genomic sequence of a *Rubus yellow net virus* isolate and detection of genome-wide pararetrovirus-derived small RNAs. *Virus Research* 178: 306–313.

- Kazmi S. A, Yang Z., Hong N., Wang G., Wang Y. (2015): Characterization by small RNA sequencing of *Taro bacilliform CH virus* (TaBCHV), a novel badnavirus. *PLoS ONE* 10(7): 1–13.
- Kouakou K., Kébé B. I., Kouassi N., Aké S., Cilas C., Muller E. (2012): Geographical distribution of *Cacao swollen shoot virus* molecular variability in Côte D'Ivoire. *Plant Disease* 96: 1445–1450.
- Lee Y., Kwak H., Lee Y., Kim M., Choi H., Seo J. (2015): Complete genome sequence of *Yacon necrotic mottle virus*, a novel putative member of the genus *Badnavirus*. *Archives of Virology* 160: 1139–1142.
- Lheureux F., Carreel F., Jenny C., Lockhart B. E., Iskra-Caruana M. L. (2003): Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 106(4): 594–598.
- Lockhart B. E. L. (1986): Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76: 995–999.
- Lockhart B. E. L., Ferji Z. (1988): Purification and mechanical transmission of *Kalanchoë top-spotting associated virus*. *Acta Horticulturae* 234: 73–77.
- Lockhart B. E. L., Kiratiya-Angul K., Jones P., Eng L., De Silva P., Olszewski N. E., Lockhart N., Deema N., Sangalang J. (1997): Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper spp.* In Southeast Asia. *European Journal of Plant Pathology* 103: 303–311.
- Lot H., Djiekpor E., Jacquemond M. (1991): Characterization of the genome of *Cacao swollen shoot virus*. *Journal of General Virology* 72: 1735–1739.
- Macanawai A. R., Ebenebe A. A., Hunter D., Devitt L. C., Hafner G. J., Harding R. M. (2005): Investigations into the seed and mealybug transmission of Taro bacilliform virus. *Australasian Plant Pathology* 34(1): 73–76.
- Maliogka V. I., Olmos A., Pappi P. G., Lotos L., Efthimiou K., Grammatikaki G., Candresse T., Katis N. I., Avgelis A. D. (2015): A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research* 203: 47–55.
- Medberry S. L., Lockhart B. E. L., Olszewski N. E. (1990): Properties of *Commelina yellow mottle virus*'s complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Research* (18) 18: 5505–5513.
- Martelli G. P., Russo M., Rubino L., Sabanadzovic S. (1998): *Aureusvirus*, a novel genus in the family *Tombusviridae*. *Archives of Virology* 143(9): 1847–1851.
- Miličić D., Plavšić B., Grbelja J., Erić Z. (1987): *Cherry leafroll virus* and Elderberry Carlavirus on *Sambucus nigra* L. in South-East Europe. *Acta Botanica Croatica* 46(1): 1–8.
- Oro F., Mississo E., Okassa M., Guilhaumon C., Fenouillet C., Cilas C., Muller E. (2012): Geographical differentiation of the molecular diversity of *Cacao swollen shoot virus* in Togo. *Archives of Virology* 57: 509–514.

- Phillips S., Briddon R. W., Brunt A. A., Hull R. (1999): The partial characterization of badnavirus infecting the Greater asiatic or water yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Phytopathology* 147: 265–269.
- Pospieszny H., Borodynko N., Jończyk M. (2004): First report of *Tomato black ring virus* (TBRV) in the natural infection of *Sambucus nigra* in Poland. *Journal of Plant Protection Research* 44(4): 373–376.
- Quainoo A. K., Wetten A. C., Allainguillaume J. (2008): Transmission of *Cacao swollen shoot virus*. *Journal of Virological Methods* 150(1,2): 45–49.
- Plavšić-Banjac B., Miličić D. (1968): Neke nove viroze drveća u Jugoslaviji (Some new virus diseases of trees in Yugoslavia). *Mikrobiologija* 5: 65–72.
- Polák Z., Procházková Z., Branišová H. (1990): Recent findings of viruses of forest trees on the territory of the Czech Republic. *Archive of Phytopathology and Plant Protection* 26: 389–393.
- Roivainen O. (1976): Transmission of cocoa viruses by mealybugs (*Homoptera:Pseudococcidae*). *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 48: 203–304.
- Rumbou A., Candresse T., Marais A., Theil S., Langer J., Jalkanen R. a Büttner C. (2018): A novel badnavirus discovered from *Betula* sp. affected by birch leaf-roll disease. *PLoS ONE* 13(3): 1–14.
- Ryabova L. A., Hohn T. (2000): Ribosome shunting in the *Cauliflower mosaic virus* 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes & Development* 14(7): 817–829.
- Rymelska N., Borodynko N., Pospieszny H., Hasiów-Jaroszewska B. (2013): Analysis of the biological and molecular variability of the Polish isolates of *Tomato black ring virus* (TBRV). *Virus Genes* 47: 338–346.
- Seal S., Muller E. (2007): Molecular analysis of a full-length sequence of a new yam badnavirus from *Dioscorea sansibarensis*. *Archives of Virology* 152: 819–825.
- Seal S., Turaki A., Muller E., Kumar P. L., Kenyon L., Filloux D., Galzi S., Lopez-Montes A., Iskra-Caruana M. (2014): The prevalence of badnaviruses in West African yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. *Virus Research* 186: 144–54.
- Sharma S. K., Kumar P. V., Poswal R., Rai R., Geetanjali A. S., Prabha K., Jain R. K., Baranwal V. K. (2014): Occurrence and distribution of banana streak disease and standardization of a reliable detection procedure for routine indexing of banana streak viruses in India. *Scientia Horticulturae* 179: 277–283.
- Schwenk F. W., Williams H. E., Smith H. S. (1969): *Alfalfa mosaic virus* from Hebe, Ilex and Viburnum. *Phytopathology* 59: 1048–1049.
- Sison M. L. J., dela Cueva F. M., Pozon A. P. M. (2017): Transmission of episomal *Banana streak virus* by mealybugs of different host plants. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 23(2): 203–214.

- Šafářová D., Vavroušková K., Candresse T., Navrátil M. (2018): Molecular characterization of a novel Aureusvirus infecting elderberry (*Sambucus nigra* L.). PLoS ONE 13(8): 1–14.
- Thottappilly G., Dahal G., Lockhart B. E. L. (1998): Studies on Nigerian isolate of banana streak badnavirus. I. Purification and enzyme-linked immunosorbent assay. Annals of Applied Biology 132: 253–261.
- Umadevi P., Bhat A. I., Krishnamurthy K. S., Anandaraj M. (2016): Influence of temperature on symptom expression and detection of host factors in *Piper yellow mottle virus* infected black pepper (*Piper nigrum* L.). Indian Journal of Experimental Biology 54: 354–360.
- Uyemoto J. K. (1970): Symptomatically distinct strains of *Tomato ringspot virus* isolated from grape and elderberry. Phytopathology 60: 1838–1841.
- Uyemoto J. K., Gilmer R. M., Williams E. (1971): Sap-transmissible viruses of elderberry in New York. Plant Disease Reporter 55: 913–916.
- Van Lent J. W. M., Wit A. J., Dijkstra J. (1980): Characterization of a carlavirus in elderberry (*Sambucus* spp.). Netherlands Journal of Plant Pathology 86(2): 117–134.
- Wang Y., Cheng X., Wu X., Wang A., Wu X. (2014): Characterization of complete genome and small RNA profile of *Pagoda yellow mosaic associated virus*, a novel badnavirus in China. Virus Research 188: 103–108.
- Woo E. N. Y., Pearson M. N. (2014): Comparison of complete nucleotide sequences and genome organization of six distinct cherry leaf roll virus isolates from New Zealand. Archives of Virology 159: 3 443–3 445.
- Yang I. C., Hafner G. J., Dale J. L., Harding R. M. (2003): Genomic characterisation of *Taro bacilliform virus*. Archives of Virology 148: 937–949.
- Zhang Y., Singh K., Kaur R., Qiu W. (2011): Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vein decline syndrome. Phytopathology 101: 1 081–1 090.
- Zhou Z. S., Dell'Orco M., Saldarelli P., Turturo C., Minafra A., Martelli G. P. (2006): Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. Journal of General Virology 87: 2387–2395.

Internetové zdroje:

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [online] [navštíveno dne 1. 4. 2020]

Dostupné z <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>

GenBank [online] [navštíveno dne 10. 4. 2020]

Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

ICTV. [online] [navštíveno 23.4.2020]

Dostupné z https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report

ViralZone. [online] [navštíveno 20.4.2020]

Dostupné z <https://viralzone.expasy.org/96>