

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělství - Rostlinolékařství

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Virus šarky peckovin**

**Vedoucí práce**

Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

**Autor**

Hedvika Jakubíková

České Budějovice, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 21. 4. 2017

.....

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D., za odborné vedení, věcné připomínky, vstřícnost a nebetyčnou trpělivost. Dále děkuji Ing. Ireně Jelínkové za ochotu a cenné rady při práci v laboratoři. Poděkování také patří kolegovi Miroslavu Holleyovi, DiS. za podporu.

## **Abstrakt**

Virus šarky švestky je původcem jedné z nejzávažnějších chorob peckovin. Práce je zaměřena na detekci viru šarky v infikované tkáni listů *Prunus domestica*. Přítomnost viru v rostlinném materiálu byla potvrzena na základě izolace virové RNA a jejího využití jako templátu pro RT-PCR. V práci jsou dále shrnuty poznatky o vlastnostech viru, běžných detekčních metodách a možnostech ochrany proti viru šarky.

**Klíčová slova:** rostlinné viry; choroby peckovin; virus šarky švestky; PPV; izolace RNA

## **Abstract**

Plum pox virus causes one of the most devastating stone fruit diseases. The main target of this thesis is a detection of Plum pox virus in infected leaf tissue of *Prunus domestica*. The presence of the virus in a plant material was confirmed by the RNA isolation and its use as a template for RT-PCR. Furthermore, the basic information about properties of the virus, common methods of the virus detection and protection possibilities against the virus is included.

**Key words:** plant viruses; stone fruit diseases; plum pox virus; PPV; RNA isolation

# **OBSAH**

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>8</b>
<b>2. 1 Taxonomické zařazení viru šarky</b> .....	<b>8</b>
<b>2. 2 Historie a rozšíření viru šarky</b> .....	<b>8</b>
<b>2. 3 Stavba vironu</b> .....	<b>9</b>
<b>2. 4 Genomická struktura viru</b> .....	<b>9</b>
<b>2. 5 Kmenová variabilita</b> .....	<b>10</b>
2. 5. 1 PPV-M (Marcus) .....	10
2. 5. 2 PPV-Am (Ancestor Marcus).....	10
2. 5. 3 PPV-D (Dideron) .....	11
2. 5. 4 PPV-Rec (Recombinant) .....	11
2. 5. 5 PPV-EA (El Amar) .....	11
2. 5. 6 PPV-W (Winona).....	12
2. 5. 7 PPV-T (Turkey) .....	12
2. 5. 8 PPV-C (Cherry) .....	12
2. 5. 9 PPV-CR (Cherry Russian).....	13
2. 5. 10 PPV-Tat izoláty .....	13
<b>2. 6 Hostitelské spektrum viru šarky</b> .....	<b>14</b>
<b>2. 7 Přenos viru šarky</b> .....	<b>15</b>
2. 7. 1 Přenos viru hmyzími vektory.....	15
2. 7. 2 Neperzistetní způsob přenosu viru.....	15
<b>2. 8 Průběh infekce</b> .....	<b>16</b>
2. 8. 1 Genová exprese.....	16
2. 8. 2 Virové proteiny a jejich význam.....	17
<b>2. 9 Příznaky napadení virem šarky</b> .....	<b>18</b>
<b>2. 10 Detekce a identifikace viru šarky</b> .....	<b>20</b>

2. 10. 1 Symptomatologie .....	21
2. 10. 2 Biologické testy .....	21
2. 10. 3 Sérologické metody .....	22
2. 10. 4 Molekulárně-biologické metody .....	23
<b>2. 11 Ochrana proti viru šarky .....</b>	<b>25</b>
<b>2. 12 Rezistence .....</b>	<b>26</b>
2. 12. 1 Šlechtění na rezistenci .....	27
2. 12. 2 Transgenoze .....	28
<b>3 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>30</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>31</b>
4. 1 Odběr vzorků rostlinného materiálu .....	31
4. 2 Izolace RNA .....	31
4. 3 Reverzní transkripce .....	32
4. 4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	33
4. 5 Agarózová elektroforéza .....	34
<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
<b>6 DISKUZE.....</b>	<b>36</b>
<b>7 ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
<b>8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>39</b>

# 1 ÚVOD

Virová onemocnění rostlin (virózy) patří k ekonomicky nejzávažnějším chorobám rostlin. Přispívají ke zhoršení zdravotního stavu a kondice a negativně ovlivňují jak výnosy zemědělských plodin, zeleniny a ovoce, tak kvalitu cílové hospodářsky využitelné produkce. Ačkoliv ve světovém měřítku netvoří škody způsobené viry ten nejvýznamnější podíl ztrát na zemědělské produkci, pro určité druhy plodin představují virové patogeny původce těch nejnebezpečnějších infekcí.

U všech druhů peckovin způsobuje právě virus šarky to nejzávažnější onemocnění - šarku peckovin (neštovice peckovin).

Virus šarky v přirozených podmínkách infikuje jak komerční odrůdy a podnože, tak okrasné nebo divoce rostoucí rostliny v rámci rodu *Prunus*. Negativní vliv choroby se nejvýrazněji projevuje v oblasti průmyslového pěstování peckovitého ovoce. U náchylných odrůd výrazně klesá produktivita a ovlivněna je i jakost plodů. Nesnadná je také produkce sadbového materiálu v ovocných školkách a to především z důvodu snadného přenosu viru hmyzími vektory a prostřednictvím vegetativních způsobů množení rostlin. Uvedené skutečnosti mají velký dopad na pěstitele peckovin. Ekonomické ztráty jsou způsobeny jak přímým poškozením plodů a jejich nízkým zpeněžením, tak i náklady na eradikaci a provádění preventivních opatření.

K detekci viru šarky v rostlinném materiálu se nejčastěji využívá sérologických metod založených na schopnosti protilátek identifikovat patogena. Nejběžnější takovou metodou je ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) a její modifikace. Rozšířené je také využití molekulárně-biologických metod na bázi PCR (Polymerase Chain Reaction), které umožní detekci viru na základě namnožení izolované nukleové kyseliny.

Předkládaná práce shrnuje poznatky o vlastnostech viru šarky a řeší problematiku a rizika pěstování peckovin. Praktická část práce se pak zabývá detekcí viru šarky, respektive ověřením vhodnosti zvolené metody identifikace viru. Námi vybrané molekulárně-biologické metody pracují s izolovanou RNA a DNA z napadené rostlinné tkáně. Získané nukleové kyseliny pak slouží k potvrzení výskytu viru v daném rostlinném materiálu.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Taxonomické zařazení viru šarky

Virus šarky (Plum pox virus, PPV) patří do rodu *Potyvirus*, který spadá do čeledi *Potyviridae*. Čeleď *Potyviridae* je taxonomicky největší a nejnebezpečnější skupina rostlinných virů. Zahrnuje celkem sedm rodů virových patogenů: již zmíněný rod *Potyvirus*, dále rody *Ipomovirus*, *Malcuravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Brambyvirus* a *Brymovirus* (King et al., 2012). Zástupci čeledi infikují celou řadu rostlin jednoděložných i dvouděložných, bylin i dřevin. Významný je zejména Y-virus bramboru, který stejně jako virus šarky náleží do rodu *Potyvirus* (Polák, 2010).

### 2.2 Historie a rozšíření viru šarky

Virus šarky byl poprvé zaznamenán v Bulharsku přibližně v roce 1917. Odtud se dále šířil do dalších oblastí Evropy. V současnosti je jeho výskyt potvrzen v Severní Americe (USA, Kanada), zemích Jižní Ameriky (Argentina, Chile) a některých asijských státech (Indie, Čína, Pákistán a další) (Hare et al., 2012). Virus šarky nebyl dosud prokázán na Novém Zélandu (EPPO Global Database, 2017). Na základě výskytu viru a četnosti napadení druhů peckovin lze rozdělit Evropu do tří oblastí. První oblast zahrnuje nejvíce zasažené země, tedy státy střední a východní Evropy, mezi něž patří i Česká republika a dále například Polsko, Bulharsko a Chorvatsko. Druhou oblastí jsou středomořské země, Itálie, Řecko, Portugalsko, atd., na jejichž území byl virus introdukován poměrně nedávno a lze zde předpokládat jeho rychlé šíření. Třetí oblast spojuje státy severní a západní Evropy, i když je situace v jednotlivých zemích značně rozdílná. Silný výskyt viru je prokázán v Německu, Velké Británii a Rakousku, v menší míře je přítomen na území Francie a Belgie, úplně vymýcen byl například v Dánsku a Švýcarsku (Roy a Smith, 1994).

První záznamy o výskytu viru šarky v České republice pochází již ze 30. let minulého století. Tehdy byla infekce rozšířena pouze v oblasti středních Čech a střední Moravy. Ještě v 60. letech nebyly zaznamenány žádné příznaky onemocnění šarkou v podhorských a horských oblastech. V průběhu dalších dvaceti let se však virus rozšířil i do vyšších poloh a dnes jej můžeme najít i ve výškách okolo 800 m. n.m. (Polák, 2010).



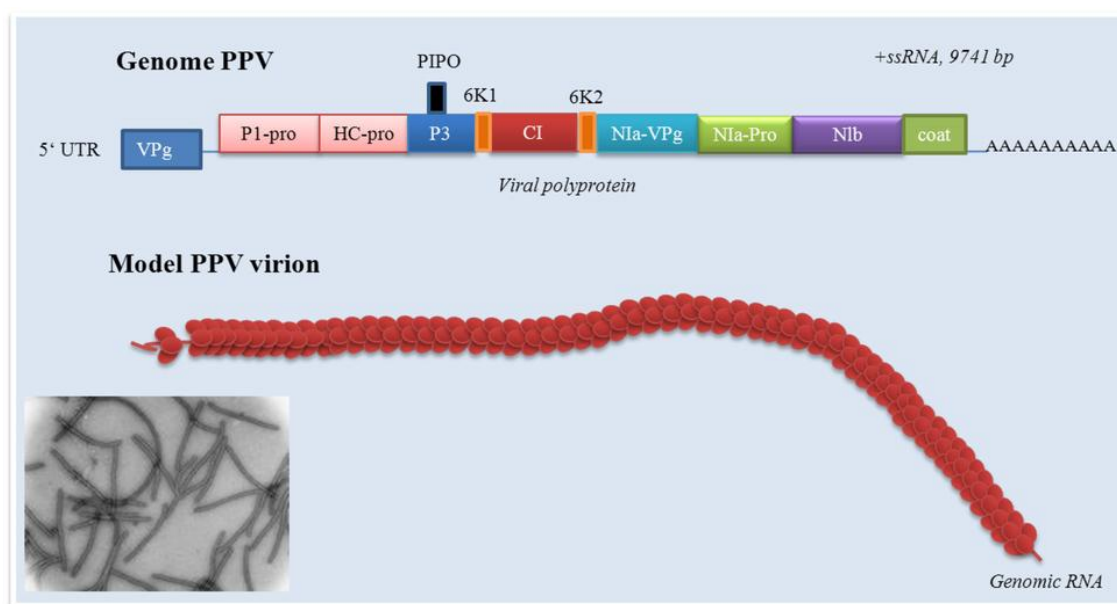
## 2.3 Stavba virionu

Částice viru šarky jsou vláknité, dlouhé 750 nm a široké 13 nm, pozorovatelné jsou pouze v elektronovém mikroskopu.

Jednotlivé viriony jsou složeny ze dvou částí. První a hlavní část virionu tvoří nukleová kyselina, která nese genetickou informaci, nezbytnou pro další množení viru (Polák, 2010). Druhou nedílnou součástí virových částic je obalový ochranný protein, který je schopen své vlastní replikace až v příhodném prostředí hostitelských buněk (Špak, 2011).

## 2.4 Genomická struktura viru

Genom viru šarky sestává z jednoho vlákna RNA s pozitivní polaritou (ss RNA (+)), které je obklopeno pouze jediným typem obalového proteinu (King et al., 2012). Na 5' konec řetězce virové RNA je napojen VPg protein, zodpovědný za systematickou infekci. 3' konec, nebo také poly A konec, se může u jednotlivých virových částic lišit svou velikostí (Sochor et al., 2012).



Obr. 1: Struktura genomu a virové částice viru šarky (Sochor et al., 2012).

## 2. 5 Kmenová variabilita

Jako kmen označujeme soubor izolátů, které jsou svými společnými charakteristickými vlastnostmi odlišné od jiného souboru izolátů (Glasa, 2010).

Klasifikace a rozlišování takových skupin se původně provádělo podle vizuálních symptomů projevujících se na napadeném hostiteli. Toto stanovení se později ukázalo jako nedostatečné. Pozorované příznaky infekce se mohly značně lišit v závislosti na podmínkách prostředí, proto nebylo možné dostatečně prokázat souvislost mezi biologickými, sérologickými a molekulárními vlastnostmi izolátů (Glasa a Candresse, 2008).

V současné době se k přesnému určení variant viru šarky používají sérologické a molekulární metody. Velké množství informací je možné získat z částečné nebo úplné sekvenace genomu.

Doposud bylo u viru šarky rozlišeno deset variant. Dělí se do dvou skupin. Majoritní kmeny PPV-M, PPV-D, PPV-Rec a minoritní kmeny, které jsou hostitelsky či geograficky limitované. Mezi ně patří kmeny PPV-Am, PPV-EA, PPV-W, PPV-T, PPV-C, PPV-CR a PPV-Tat izoláty. Jednotlivé kmeny se od sebe liší molekulárními, sérologickými a biologickými vlastnostmi .

Na území ČR jsou peckoviny infikovány převážně typem PPV-D. Na jižní Moravě se ojediněle vyskytují kmeny PPV-M a PPV-Rec. Doposud zde nebyla prokázána přítomnost kmenů PPV-C, PPV-Ea ani PPV-W (Glasa, 2010).

### 2. 5. 1 PPV-M (Marcus)

Kmen PPV-M byl poprvé identifikován v Řecku na broskvoni. V současné době se vyskytuje téměř na celém území Evropy, zejména v jižní a východní části. V Americe a Číně zatím zaznamenán nebyl (Glasa, 2010).

V Evropských podmínkách je velmi efektivně a rychle přenášen mšicemi. Napadá především broskvoně, méně často byl zjištěn na meruňkách či švestkách (Candresse a Cambra, 2006).

V rámci kmene PPV-M je možné ještě rozlišit dvě podskupiny. Odlišné vlastnosti obou izolátů závisí na jejich geografickém původu (García et al., 2014).

### 2. 5. 2 PPV-Am (Ancestor Marcus)

Jediný izolát kmene PPV-Am pochází z východní Albánie, kde byl nalezen na švestce (*Prunus domestica*). Na jeho 3' konci genomu chybí sekvence adeninových nukleotidů, zvaná poly A konec (poly A tail). Nejvíce se podobá kmeni

PPV-T, jistou podobnost však vykazuje i s kmeny PPV-C a PPV-W. Na základě své genomové struktury je PPV-Am považován za možného "předchůdce" kmene PPV-M (Delano et al., 2013).

### **2. 5. 3 PPV-D (Dideron)**

PPV-D je celosvětově nejrozšířenějším kmenem. Nejprve byla zaznamenána jeho přítomnost v Evropě (poprvé byl izolován ve Francii), odtud se rozšířil do Asie i Severní a Jižní Ameriky (Glasa a Candresse, 2008).

Vyskytuje se u většiny druhů rodu *Prunus*, na rozdíl od typu PPV-M se však relativně málo vyskytuje na broskvoních. Vůbec nenapadá třešně ani višně (ÚKZÚZ, 2011). Virový kmen PPV-D se také podstatně hůře šíří mšicemi než PPV-M (Candresse a Cambra, 2006).

### **2. 5. 4 PPV-Rec (Recombinant)**

PPV-Rec je první známou rekombinací mezi kmeny viru šarky. Jedná se o kombinaci mezi typy PPV-D a PPV-M. 5'konec genomu je s kmeny PPV-D a PPV-M shodný, nová varianta je následkem změny v oblasti 3'konce (James a Glasa, 2006). Většina genomu izolátu PPV-Rec je totožná s PPV-D. V oblasti za rekombinančním genem dochází ke změně homologie, což znamená, že gen pro CP (plášťový protein) už je typu PPV-M. Proto jsou kmeny M a Rec od sebe sérologicky nerozlišitelné a dříve byly považovány za jednu kmenovou variantu. (Polák, 2010).

Za oblast vzniku varianty PPV-Rec je považován Balkán, první rekombinantní kmen byl izolován v Srbsku (García et al., 2014). Odtud se pravděpodobně rozšířil do dalších evropských zemí. Dnes je hojně zastoupen zejména ve státech střední a východní Evropy (Glasa a Candresse, 2008), nalezen byl však i v mimoevropských zemích.

Obdobně jako PPV-D se typ Rec příliš často nevyskytuje na broskvoních. Efektivita přenosu Rec mšicemi mezi broskvoněmi je velmi nízká (Candresse a Cambra, 2006). Vyšší frekvence napadení kmenem PPV-Rec byla zaznamenána u meruněk a slivoní, kde již lze přenos mšicemi označit za efektivní (Glasa a Candresse, 2008).

### **2. 5. 5 PPV-EA (El Amar)**

Kmen PPV-EA byl poprvé izolován z tkáně meruněk pocházejících z egyptského regionu El Almar. Poté byl objeven i v dalších oblastech Egypta na

broskvoních. Jeho výskyt mimo Egypt zatím nebyl zaznamenán (Glasa a Candresse, 2008).

#### **2. 5. 6 PPV-W (Winona)**

PPV-W, nejprve označen jako PPV-W3174, byl izolován ze stromu slivoně v Kanadě. Později byl zaznamenán na Litvě, na Ukrajině a v Rusku.

Variabilita uvnitř kmene PPV-W je mnohem vyšší než u ostatních kmenů. Tento fakt byl potvrzen analýzou celkového genomu i jeho části (García et al., 2014). Například PPV-W izolát, označen 3147, je už sám o sobě rekombinací kmene W a navíc vykazuje další možnou kombinaci s kmeny M, D a Rec.

W typ vykazuje pouze nepatrné, mírné příznaky na listech, na plodech se napadení neprojeví vůbec (James a Glasa, 2006). Ze všech kmenů má nejširší hostitelský okruh. Byl identifikován na slivoních, trnkách, slivoni třešňové a slivoni plstnaté (Delano et al., 2013).

#### **2. 5. 7 PPV-T (Turkey)**

PPV-T je dalším rekombinantním kmenem viru šarky. U izolátu Abricotier Turquie (Ab - Tk) proběhly rekombinační změny na 5'konci genomu. Izolát je popisován jako "mozaikový rekombinát", část genomu má shodnou s M kmenem a zároveň tvoří jakýsi mezistupeň mezi M a Rec kmenem.

Všem rekombinátům uvnitř izolátu PPV-T je společná změna v oblasti genu pro protein HC-Pro (viz kap. 2. 7). Na základě této skutečnosti byl PPV-T ustanoven jako samostatný kmen.

PPV-T byl zaznamenán pouze v Turecku, infikuje broskve, meruňky a slivoně. Jeho výskyt na tomto území lze vyvodit z přítomnosti kmenů D a M, které se v oblasti Turecka vyskytovaly již dříve (Delano et al., 2013).

#### **2. 5. 8 PPV-C (Cherry)**

První izoláty PPV-C pocházely z višně z Moldávie a třešně ptačí z Itálie, ačkoliv byly tyto druhy rodu *Prunus* považovány za rezistentní. Izoláty z obou druhů se mezi sebou jen nepatrně liší ve složení kódujícího polyproteinu a obalového proteinu (Delano et al., 2013). Typ C byl zaznamenán kromě Itálie a Moldávie také v Maďarsku, Chorvatsku a Bělorusku (García et al., 2014).

PPV-C je jediným kmenem viru šarky, který systematicky napadá třešně a mahalebku. V experimentálních podmínkách může také infikovat další zástupce rodu *Prunus*. Virový kmen se velmi dobře šíří pomocí mšic (Glasa a Candresse, 2008).

### **2. 5. 9 PPV-CR (Cherry Russian)**

PPV-CR je nejnověji rozpoznáným kmenem. Byl objeven na višních městské okrasné výsadby v Moskvě (Chirkov et al., 2013). Další izoláty pocházely i z navzájem velmi vzdálených lokalit, předpokládá se tedy, že kmen PPV-CR je hojně rozšířen v celé evropské části Ruska (Delano et al., 2013).

V rámci rodu *Prunus* napadá PPV-CR pouze višně. Typ CR je ve stavbě genomu velmi podobný kmenu PPV-C. Při srovnání CR a C izolátů bylo objeveno několik desítek shodných sekvencí aminokyselin, které jsou sdíleny ve všech jejich proteinech (vyjma 6K1). Největší zastoupení těchto sekvencí bylo objeveno u virových proteinů P1, NIa a CP (kap. 2. 8). Právě tyto proteiny se speciální sekvencí aminokyselin jsou s největší pravděpodobností zodpovědné za zúžený hostitelský rámec obou kmenů.

Od kmene PPV-C se PPV-CR liší ve složení kódujícího polyproteinu. Tato změna je následkem absence jednoho tripletu v koncové části genu pro NIb. Chybějící část genu způsobí změnu ve stavbě aminokyselin a tím ovlivní i výsledný polyprotein.

Typ CR se projevuje podobnými symptomy jako ostatní kmene viru šarky, tedy vyblednutím okolo žilnatiny listu, světlými skvrnami prstencovitého tvaru a někdy také pokroucením listu (Glasa et al., 2013). Na rozdíl od varianty PPV-C však nebyly na rostlinách napadených kmenem PPV-CR zpozorovány žádné příznaky na plodech (Chirkov et al., 2013).

### **2. 5. 10 PPV-Tat izoláty**

Jako PPV-Tat izoláty byla nazvána skupina navzájem si podobných izolátů, pocházející z východní části Ruska, z federální republiky Tatarstán. Tat izoláty byly získány z listů višně s běžnými příznaky napadení virem šarky, tedy s chlorotickými prstencovitými skvrnami. Původně byly Tat izoláty považovány za jeden z kmenů PPV-C a PPV-CR, neboť pouze tyto dva kmene jsou schopné infikovat višně. Nicméně detekce metodou RT-PCR se specifickými primery pro typy C a CR selhala.

Nový kmen byl identifikován až za opětovného použití metody RT-PCR ovšem s primery pro PPV-D a imunologické metody TAS-ELISA s využitím monoklonální protilátky AC, která je specifická pro typ PPV-C. Z těchto faktů vyplývá, že kmen PPV-Tat je velmi divergentní skupinou. Vykazuje podobnost hned s několika kmeny viru šarky. Například již zmíněná schopnost napadat pouze višně spočívá v uspořádání 3' konce genomu a je společná s variantami C a CR. Analýza genomu v části pro N1b a CP odhalila vysokou podobnost také s kmeny PPV-D, PPV-EA a PPV-Rec, nicméně míra podobnosti se zmíněnými kmeny se u jednotlivých izolátů PPV-Tat izoláty značně lišila. Na základě vysoké specifčnosti izolátů je možné o každém z nich uvažovat jako o potenciálním zakladateli nové kmenové linie v rámci viru šarky (Chirkov et al., 2017).

## 2. 6 Hostitelské spektrum viru šarky

Virus šarky napadá většinu zástupců rodu *Prunus* a způsobuje značné ekonomické ztráty u kulturních druhů peckovin, zejména meruněk (*Prunus armeniaca*), broskvoní (*P. persica*) a slivoní (*P. domestica*, *P. insititia*). Vážné škody může také způsobovat u višně (*P. cerasus*), třešně (*P. avium*) a mandloní (*P. dulcis*). Višně a třešně jsou vůči viru šarky vysoce rezistentní. Infekce často probíhá bezpříznakově, zejména při napadení kmenem PPV-D (Hare et al., 2012). V České republice dosud nebyl prokázán přirozený výskyt šarky ve višňových ani třešňových sadech, přítomnost viru nebyla zaznamenána ani u třešně a višně rostoucích.

Virem šarky jsou ohroženy také okrasné a planě rostoucí druhy rodu *Prunus*. Z okrasných je to například višně plstnatá (*P. tomentosa*), mandloň trojlaločná (*P. triloba*), slivoň vrbová (japonská švestka) (*P. salicina*), třešně japonská (*P. japonica*) meruňka japonská (*P. mume*) a slivoň žláznatá (*P. glandulosa*). Z planě rostoucích druhů lze jmenovat slivoň myrobalán (*P. cerasifera*) a trnku obecnou (*P. spinosa*) (Polák, 2010).

Za přirozené hostitele viru šarky jsou také považovány dřeviny jiných čeledí. Mezi ně patří jeřáb oskeruše (*Sorbus domestica*), ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare*) a brslen evropský (*Euonymus europaea*) (Damsteegt et al., 2007). Podle Baumgartnerové (1977) byly typické příznaky choroby pozorovány i na listech a pupenech ořešáku (*Juglans regia*), nicméně ořešák nebyl jako přirozený hostitel viru šarky potvrzen (Polák, 2006).

Virus šarky byl experimentálně přenesen na další kulturní nebo plevelné rostliny. Takto infikované rostliny jsou pouze experimentálními hostiteli, nemají tedy žádný praktický význam v epidemiologii ani pro další šíření viru šarky. Pokusný hostitelský okruh čítá více než devět čeledí. Jako příklad lze uvést merlíkovité - *Chenopodiaceae* (*Chenopodium album*, *Ch. foetidum*), lilkovité - *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum*, *Solanum nigrum*), hvězdnicovité - *Asteraceae* (*Senecio vulgaris*), vikvovité - *Viciaceae* (*Lupinus albus*, *Pisum sativum*, *Trifolium pratense*) a brukvovité - *Brassicaceae* (*Capsella bursa-pastoris*) (Polák, 2010).

## **2. 7 Přenos viru šarky**

Šíření viru šarky švestky na dlouhé vzdálenosti a nová území, ve kterých doposud nebyl identifikován, je zprostředkováno především obchodem s infikovaným rostlinným materiálem. Jedná se zejména o školkařské výpěstky. Dalším možným způsobem introdukce viru do oblastí prostých nákazy je prostřednictvím roubů a materiálem k vegetativnímu množení, který byl odebrán z infikovaných rostlin (Glasa a Candresse, 2008).

### **2. 7. 1 Přenos viru hmyzími vektory**

Nejrychleji a nejefektivněji je virus šarky šířen pomocí hmyzích vektorů, mezi něž patří zejména mšice. V současnosti je známo více než dvacet druhů mšic, které se na přenosu viru šarky podílí. Nejvýznamnějšími přenašeči jsou mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice chmelová (*Phorodon humuli*) a mšice střemchová (*Rhopalosiphum padi*) (Glasa a Candresse, 2008). Mšice přenáší virus jen na krátké vzdálenosti. Nejčastěji se jedná o transport viru mezi jednotlivými stromy v ovocných sadech. Z takového "rezervoáru" je virus dále rozšiřován do blízkého okolí. Na stiletu mšice je virus aktivní pouze několik minut či hodin (Brault et al., 2010). Efektivita přenosu viru mšicemi závisí na četnosti populace a období výskytu vektorů, na druhu hostitele a rostlinném orgánu, ze kterého mšice virus získá a v neposlední řadě také na možných změnách a mutacích genomu viru (Lowery et al., 2015).

### **2. 7. 2 Neperzistetní způsob přenosu viru**

Pod pojmem neperzistetní přenos viru rozumíme takový způsob transportu virových částic, při kterém dochází pouze k minimálnímu kontaktu vektoru jak s

infikovanou rostlinnou tkání, tak se samotným virem. Virus navíc v těle vektora nepřetrvává, je přítomen pouze na části jeho ústního ústrojí. V případě přenosu viru šarky nezůstává vektor po uvolnění či předání viru novému hostiteli nadále infekční (Brault et al., 2010).

V rámci neperzistentního přenosu viru je možno rozlišit dva rozdílné způsoby interakce mezi vektorem a přijímaným virem. Prvním způsobem je tzv. "capsid strategy", při níž virus interaguje s vektorem pouze prostřednictvím svého obalového proteinu. Při druhém způsobu, který se uplatňuje právě při přenosu viru šarky a je označován jako "helper strategy", probíhá interakce mezi vektorem a virem přes prostředníka. Tím je virový nestrukturní protein HC-Pro ("helper component - proteinasa") (Brault et al., 2010). Součástí HC-Pro jsou aminokyselinové struktury, které vzájemným působením a působením na podobné struktury obalového proteinu viru ovlivňují stilet (resp. domnělý receptor stiletu) po jeho kontaktu s virovými částicemi. Mezi vektorem a virem se vytvoří jakýsi molekulární most, sepjetí, které viru zajistí přenos k novému hostiteli (Šubr a Glasa, 2013).

## **2. 8 Průběh infekce**

Při průniku do buněk hostitelské rostliny musí viry překonat její obranné mechanismy, například voskovou kutikulu nebo buněčnou stěnu. V případě viru šarky je průnik těmito bariérami zajištěn mšicemi, jejichž stilet implantuje virus přímo do buněk rostliny.

Počátkem infekčního cyklu rozumíme okamžik, kdy virus prostoupil buněčnou stěnou a je přítomen uvnitř hostitelské buňky. Zde dochází k uvolnění nukleové kyseliny z obalových struktur viru. Poté následuje translace a replikace virového genomu. Produkty translace a replikace, tedy proteiny a nukleové kyseliny, jsou pak shromážděny, uspořádány a opět obaleny plášťovým proteinem. Takto vytvořené kompletní viriony opouští původní buňku prostřednictvím plasmodesmat. Uvolněné virové částice mohou infikovat další buňky (Hull, 2009).

### **2. 8. 1 Genová exprese**

Virus šarky patří do skupiny virů s jednořetězcovou RNA s pozitivní polaritou. Po uvolnění RNA z virového obalu do cytoplazmy hostitelské buňky nedochází k transkripci (přepisu informací do mRNA) jako u ostatních virových tříd.



RNA viru šarky slouží přímo jako matrice pro translaci, tedy syntézu virových proteinů (Hull, 2009).

Genomická RNA viru šarky kóduje dva hlavní polyproteiny. Dlouhý "otevřený čtecí rámec" (open reading frame, ORF) a druhý, poměrně kratší "otevřený čtecí rámec". Krátký ORF vzniká "skluzem" (slippage) RNA polymerázy na dlouhém ORF přesně v oblasti sekvence kódující budoucí P3 protein. Na počátku translace jsou zmíněné dva polyproteiny proteolyticky rozštěpeny třemi virovými proteinázami na finální produkty. Těmi je 11 dílčích proteinů P1, HCPro, P3N-PIPO, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIapro, NIb a obalový protein CP (Cui a Wang, 2016).

Replikace nukleové kyseliny viru šarky, stejně jako ostatních ssRNA (+) virů, je soustředěna v takzvaných replikačních komplexech. Virový replikační komplex (VRC) je tvořen jak virem tak rostlinou. Účastní se ho virové proteiny ale především membránové struktury hostitelské buňky.

Klíčovým enzymem, který katalyzuje celý proces replikace RNA je RNA-dependentní RNA polymeráza NIb (García et al., 2014). Její základní funkce spočívá v syntéze nového vlákna RNA podle templátu. Templátem pro replikaci je v případě viru šarky původní virová ssRNA (+), ke které NIb polymeráza syntetizuje komplementární vlákno RNA s negativní polaritou. Podle něj je pak tvořena nová ssRNA (+). Pro replikaci je podstatná i přítomnost enzymu helikázy, který přemísťuje komplementární vlákna při zdvojování RNA a odstraňuje replikací vzniklé sekundární struktury z templátů nukleových kyselin (Hull, 2009).

### **2. 8. 2 Virové proteiny a jejich význam**

Výše jmenované virové proteiny mají zodpovědnost za celý infekční cyklus virionu. Jejich důležitost lze demonstrovat na několika příkladech. Hlavní význam pro samotnou replikaci viru mají proteiny Vpg, CI, NIa-Pro a NIb, které se ve spojení s proteinem 6K2 podílejí na tvorbě zmíněného virového replikačního komplexu. Proteináza P1 ovlivňuje ribozomy napadené buňky a tím zajistí translaci virových proteinů přímo uvnitř hostitele (Cui a Wang, 2016). Protein CI působí změny tvaru plasmodesmat a umožní prostupování viru mezi buňkami. P3-PIPO spolupracuje s CI proteinem. Usměňuje jeho působení v membránových strukturách a podílí se tedy jak na tvarových změnách plasmodesmat, tak na šíření viru v infikovaných buňkách (Taiyun et al., 2010). Další proteináza NIapro zase zajišťuje zachování

virového polyproteinu v cytoplazmě infikovaných buněk a může se podílet na degradaci nespecifické hostitelské DNA (Sochor et al., 2012).

## 2. 9 Příznaky napadení virem šarky

Typické symptomy napadení virem šarky se nejčastěji objevují na listech hostitele, nicméně mohou být přítomny i na květech, plodech, peckách, mladých výhoncích či kůře stromů. V počátečním stadiu infekce se vyskytují pouze na některých částech rostlin, postupem času se však dále šíří.

Na listech je možno pozorovat chlorotické prstencovité skvrny, světlé drobné tečky nebo mozaikovitě kresby. Listy meruněk často vybledávají v okolí žilnatin. Zejména u broskvoní se silnější napadení také projevuje různými deformacemi a pokroucením listů (Glasa a Candresse, 2008). Blednutí listů a tvorba chlorotických skvrn je ovlivněna interakcí mezi virem a hostitelem. Virové proteiny HC-Pro a P1, které za tento vztah zodpovídají, interagují také s proteiny chloroplastů hostitelské rostliny. Dochází tak ke změně koncentrace chlorofylu a následné chlorotizaci listů (obr. 2) (Nagyová et al., 2012).



Obr. 2: Chlorotické a nekrotické skvrny na listech slivoně.

Zdroj: EPPO Global database, 2017.

Pro květy broskvoní je charakteristická změna zbarvení, která spočívá v tmavě růžovém podélném pruhování okvětních lístků. Tento jev je označován jako "color-breaking" (obr. 3).



Obr. 3: Jev "color breaking" na květech broskvoně.

*Zdroj: EPPO Global database, 2017.*

Povrch plodů náchylnějších odrůd slivoní je často zvrásněný s kruhovitými propadlinami (obr. 4). Dužnina ovoce je v okolí pecky zarudlá až zahnědlá. Tolerantní odrůdy obvykle příznaky na plodech nevykazují. Na meruňkách se také objevují světlejší okrouhlé dolíky, dále jsou pro ně typické světle žluté prstencovité skvrny s tmavším středem na peckách (obr. 5).



Obr. 4: Poškození povrchu plodů slivoně.

*Zdroj: EPPO Global database, 2017.*

Pro méně odolné odrůdy meruňek a slivoní je příznačné opadávání nezralého ovoce. Povrchová struktura broskví se většinou nijak tvarově nemění, přítomny jsou pouze opět světlé prstencovité skvrny či bledé difúzní pruhy. Obecně jsou příznaky onemocnění šarkou u broskvoní mnohem méně nápadné a viditelné než u slivoní nebo meruňek. Plody třešní mohou být lehce deformované s chlorotickými či

nekrotickými prstencovitými skvrnami, někdy jsou také přítomny hlubší podlouhlé propadliny připomínající zářezy (Glasa a Candresse, 2008). Ovoce z napadených stromů je obecně menší a jeho gumovitá dužnina obsahuje vyšší podíl organických kyselin a méně cukru, zejména sacharózy. Takové plody jsou pak nevhodné pro konzumaci nebo další průmyslové zpracování.



Obr. 5: Prstencovité skvrny na pece meruňky.

Zdroj: EPPO Global database, 2017.

Infekce virem šarky může probíhat i bez viditelných příznaků napadení. Intenzita projevu a přítomnost symptomů závisí na konkrétním kmenu viru šarky, tedy původci infekce, odolnosti napadeného druhu rostliny nebo jeho odrůdy a také na zdravotním stavu a stáří hostitele. Dalšími faktory, které míru výskytu příznaků ovlivňují, jsou bezpochyby podmínky prostředí, tedy lokalita, teplota a roční období (Hare et al., 2012).

## 2. 10 Detekce a identifikace viru šarky

Metody detekce rostlinných virů slouží především k potvrzení přítomnosti, identifikaci a klasifikaci konkrétního patogenního organismu v hostiteli a ke zkoumání jeho vlastností. Nejdůležitější diagnostické metody jsou založeny na odlišných morfologických, sérologických, molekulárních a patogenních vlastnostech virů. Pro primární diagnostiku viru je obvykle zapotřebí užití více metod, zatímco při

rutinním testování se zpravidla používá jedna ověřená metoda. Kombinace více metod se také využívá pro zjišťování konkrétních vlastností daného viru.

V případě viru šarky nacházejí diagnostické metody praktické využití v ověřování nezávadnosti sadbového materiálu určeného k prodeji, selekčních programech pro produkci rezistentních odrůd a monitoringu šíření viru na dosud nezasažená území (Glasa a Candresse, 2008). Klíčovým bodem pro detekci viru šarky je volba správné metody. Nejprve je nutné zvolit postup, kterým budou vytyčené cíle analýzy naplněny co nejlépe, a dále je potřeba zvážit různé limitující faktory detekce viru šarky (Sochor et al., 2012). Jedním z nich je například nepravidelné rozšíření a přemísťování viru v napadené rostlině v závislosti na její růstové fázi nebo nízký titr viru mimo období aktivního růstu (López-Moya et al., 2000). Mezi základní metody detekce viru šarky patří biologické testy a sérologické a molekulárně-biologické metody (García et al., 2014). Virus šarky lze také identifikovat na základě jeho typických symptomů (Špak, 2011).

### **2. 10. 1 Symptomatologie**

Symptomatologie slouží k určování napadených rostlin dle typických příznaků infekce. Využívá se především k negativní selekci virózních rostlin. Symptomy viru šarky jsou vyjmenovány v kapitole 2. 9.

Výhoda této metody spočívá v nízkých nákladech a rychlosti provedení. Neumožňuje však jednoznačně stanovit původce choroby. Není tudíž ani možné určit konkrétní kmen viru šarky. Další problém spočívá v odhalení latentní (bezpříznakové) infekce, která je v případě napadení virem šarky poměrně častá. Symptomatologie je navíc značně subjektivní a vyžaduje dlouholeté zkušenosti (Špak, 2011).

### **2. 10. 2 Biologické testy**

Podstata biologických testů spočívá v přenosu viru na tzv. indikátorové (diferenční) hostitelské rostliny, které se vyznačují svou citlivou reakcí (tvorbou symptomů) na virovou infekci. Transmise viru se uskutečňuje prostřednictvím očkování (mechanické inokulace), roubování nebo přenosem vektory (Špak, 2011).

Soubor diferenčních rostlin, vhodných pro biologické testy, můžeme rozdělit na skupinu bylinných a dřevitých hostitelů. Rostliny první skupiny jsou využívány k přenosu virů mechanickým očkováním nebo vektory. Jejich vhodnost pro pokusné účely spočívá v jednoduchosti pěstování (obvykle ve skleníku), vysoké vnímavosti k

probíhající infekci a v rychlosti poskytování jasně viditelných a výrazných příznaků onemocnění. Umožňují také rychlé množení viru a tím odběr vzorků s vysokým titrem pro následnou purifikaci. Díky své vysoké citlivosti mohou také odhalit latentní infekce. Mezi bylinné indikátory patří merlík smradlavý (*Chenopodium foetidum*) a lilík mochyňovitý (*Nicandra physalodes*), u nichž se infekce projevuje pouze lokálními lézemi, zatímco u některých druhů tabáku, například u *Nicotiana acuminata*, *N. benthamiana* a *N. clevelandii* pak disponuje příznaky choroby celá rostlina.

Dřevitými experimentálními hostiteli jsou druhy nebo odrůdy rodu *Prunus* citlivé k napadení virem šarky. Slouží jako podnože, na než je virus přenášen roubováním (Hare et al, 2012). Nejčastěji využívaná podnož je kultivar broskve GF 305 (*Prunus persica*, cv. GF 305) a okrasná višně plstnatá (*P. tomentosa*). *P. tomentosa* je pro biologické testování vhodnější. Projevy nákazy nastupují mnohem rychleji než u podnože GF 305 a navíc je dle přítomných symptomů možné rozlišit, zda byla *P. tomentosa* infikována kmenem PPV-D nebo PPV-M (Damsteegt et al., 1997).

K detekci viru šarky pomocí roubování se ovšem využívají i další zástupci rodu *Prunus*, například *P. japonica*, *P. maritima*, *P. siberica* (Sochor et al., 2012) nebo hybridní podnož *P. persica* x *P. davidiana* (García et al., 2014). Nevýhodou přenosu viru na dřevité indikátory je bezesporu vyšší nákladnost než u indikátorů bylinných, a také delší časové období potřebné k projevu příznaků infekce (Hare et al., 2012).

Indikátorové rostliny mohou být využity jako rezervoáry viru pro další pokusy. Ve srovnání s dalšími detekčními metodami se však jeví méně výhodné, zejména kvůli pracnosti, dlouhodobosti, vysokým nárokům na prostory a poměrně nízké spolehlivosti (Šubr a Glasa, 2013).

### **2. 10. 3 Sérologické metody**

Nejvyužívanější sérologickou metodou detekce viru šarky je enzymová imunisorbční analýza - ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Její největší předností je možnost jak kvalitativního, tak kvantitativního stanovení viru, rychlost, jednoduchost a práce s malými objemy reakčních činidel. Podstatou ELISA metody je využití specifických protilátek (IgG), proteinů, syntetizovaných v organismu zvířete jako odpověď na přítomnost antigenu. Specifita protilátek spočívá

v jejich schopnosti na sebe vázat antigen, který vyvolal jejich tvorbu. Spojení antigen-protilátka se označuje jako imunokomplex. Detekce imunokomplexu je zajištěna enzymem vázaným na volné protilátce shodné s protilátkou imunokomplexu. Pro potřeby ELISA testu se využívají dva typy protilátek, které se liší svou vazbou na epitopy antigenu. Polyklonální protilátky mohou rozpoznat epitopů více, zatímco monoklonální protilátky rozeznají pouze jeden. Zaručují tak větší specifickou a v důsledku toho i citlivost celého testu (Crowther, 2001).

V současné době je známo mnoho modifikací ELISA testu. V praxi se pro detekci viru šarky nejběžněji používají varianty DAS-ELISA, DAS-ELISA a TAS-ELISA. (Sochor et al., 2012).

Pro detekci jakéhokoli izolátu viru šarky se nejčastěji využívá univerzální monoklonální protilátka 5B-IVIA. K rozlišení jednotlivých virových kmenů se pak používají protilátky specifické. Pro kmen PPV-D je to například protilátka 4D, typ PPV-M může být rozpoznán protilátkou AL. Uvedené principy ELISA testu mohou pro identifikaci viru využít jak polyklonální, tak monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky se však častěji využívají v metodě DAS-ELISA. V současné době jsou protilátky běžně dostupné v komerčních kitech (Normes OEPP EPPO Standards, 2004).

#### **2. 10. 4 Molekulárně-biologické metody**

Nejběžnější molekulárně-biologickou metodou je polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction). V současné době se k detekci patogenních organismů využívá i řada jejích modifikací. Některé z nich budou uvedeny níže.

Podstatou PCR je enzymatická amplifikace zvoleného úseku DNA. Vybraný segment nukleové kyseliny je ohraničen specifickými primery a následně pomocí termostabilní DNA-polymerázy namnožen do mnoha kopií.

Přímá detekce RNA virů, tedy i viru šarky, není pomocí PCR možná. Část izolované RNA musí být nejprve za pomoci specifických primerů a enzymu reverzní transkriptázy převedena na cDNA (complementary DNA). Teprve až získaná cDNA může sloužit jako templát pro PCR. Tento postup je označován jako RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) (Hull, 2009).

Hlavním problémem, který zapříčiňuje negativní výsledky a špatný průběh RT-PCR je kontaminace izolované RNA. Pletiva dřevitých rostlin mají větší obsah

polysacharidů a fenolických složek. Při homogenizaci vzorku tvoří tyto látky vazby s proteiny i nukleovými kyselinami. Přítomností takových inhibitorů je ovlivněna aktivita reverzní transkriptázy i spolehlivost reakce. Z tohoto důvodu je častěji využívána One-Step-RT-PCR, což je v podstatě rychlejší a přesnější modifikace RT-PCR. Další možnou variantou RT-PCR je Two-Step-RT-PCR. V prvním kroku reakce se vytvoří cDNA, druhý krok již zahrnuje amplifikaci cílených úseků nukleové kyseliny (Jirošová et al., 2008).

Jednou z vysoce citlivých modifikací PCR je také metoda IC-PCR (Immunocapture PCR), která podobně jako ELISA test, využívá k detekci virových částic specifické protilátky. S výhodou se používá u vodných roztoků nebo jiných biologických materiálů s nízkou koncentrací viru. Pro diagnostiku RNA virů je do sledu reakcí zařazena reverzní transkripce. Takto pozměněná metoda se potom označuje IC-RT-PCR (Burns, 2010). Metodami RT-PCR a IC-RT-PCR může být pomocí primerů P1 a P2 detekován libovolný izolát viru šarky. K identifikaci jednotlivých kmenů se pak použijí primery specifické pro konkrétní kmen, například PD pro PPV-D a PM pro PPV-M (Normes OEPP EPPO Standards, 2004).

Další upravenou PCR metodou, využívanou k detekci viru šarky, je Co-PCR (Co-operational amplification). Co-PCR se od ostatních PCR modifikací liší použitím čtyř specifických primerů, které při umístění na templát tvoří vnější a vnitřní "primerový" pár. Jejich souběžnou činností tak při reverzní transkripci vznikají dvě rozdílné cDNA. V počáteční fázi amplifikace jsou pak koordinovaným působením primerů generovány čtyři amplikony rozdílné délky. V následujících krocích se za spolupráce amplikonů (které mohou sloužit také jako primery) vytvoří finální nejdelší produkt. Výhoda Co-PCR spočívá zejména v jednoduchosti a rychlosti. Tím, že probíhá pouze jedna reakce v jediném kroku, se značně snižuje riziko možné kontaminace a jsou eliminovány ztráty na výtěžnosti konečného produktu (Olmos et al., 2002).

Metody detekce založené na PCR jsou obecně více využívané než ELISA testy, kvůli větší přesnosti, rychlosti a specifitě. Často se však pro přesnost a ověření správnosti výsledků používá kombinace metod molekulárních a sérologických (Hare et al., 2012).

Nejnovější molekulárně biologickou amplifikační metodou je LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Detekce viru šarky pomocí LAMP zahrnuje krok reverzní transkripce. Tento postup je pak možno přesněji označit jako RT-LAMP.



Oproti klasické PCR metodě využívá LAMP čtyři specifické primery a probíhá za konstantní teploty. Typickými vlastnostmi LAMP metody je rychlost, jednoduchost, menší nákladnost (není nutné využití speciálních reagens ani vybavení) a také mnohem větší citlivost a efektivita (Notomi et al., 2015).

## 2. 11 Ochrana proti viru šarky

Podle platné legislativy ČR a EU (ÚKZÚZ, 2011) a podle mezinárodní organizace na ochranu rostlin EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) je virus šarky švestky řazen mezi karanténní škodlivé organizmy (Rimbaud et al., 2015). Zásady ochrany proti viru šarky vychází z principů fyto-sanitárních opatření .

Hlavním problémem v oblasti ochrany proti šarce je nemožnost léčení nemocných stromů. Chemické zásahy proti přenašečům viru také nejsou efektivní, zejména proto, že virus je mšicemi přenášen neperzistentně. Využití biologické ochrany se nabízí pouze v ekologickém zemědělství. Navzdory tomu se lze proti viru šarky účinně bránit dodržováním preventivních opatření (ÚKZÚZ, 2014).

Základem prevence proti viru šarky je produkce zdravého sadbového materiálu. Ovocné školky by měly být zakládány ideálně v oblastech bez výskytu viru. Pokud to však není možné, měly by se nacházet co nejdál od potenciálního zdroje infekce nebo alespoň v určité ochranné vzdálenosti (Rimbaud et al., 2015). V ČR je nezávadnost pěstovaných rostlin ve školkách kontrolována pracovníky ÚKZÚZ. Zjištěné infikované stromy má školkař za povinnost okamžitě zlikvidovat. Pěstování i prodej výpěstků napadených virem šarky je zakázán. Veškerý materiál k prodeji musí být navíc uznaný ÚKZÚZ (Polák, 2006).

Situace v ovocných školkách v ČR se oproti minulým letům značně zlepšila. Polák (2016) ve svém výzkumu z let 2012-2015 uvádí, že ve čtyřech školkách testovaných na výskyt PPV bylo v průměru napadeno pouze 0,075% pěstovaných stromů. V roce 1963 se průměrný počet infikovaných stromů v některých školkách pohyboval až okolo 5%. Podle Poláka za toto výrazné snížení výskytu viru šarky ve školkách mohou právě zavedená kontrolní opatření, vzdělávání školkařů v oblasti problematiky viru šarky a také již výše zmíněná likvidace napadených rostlin, která značně znesnadňuje přenos viru mšicemi (Polák, 2016).

Při zakládání vlastní výsadby peckovin je z hlediska omezení šíření viru šarky nutné použít sadbu uznanou ÚKZÚZ nebo zcela viru prostý rostlinný materiál označený visačkou VF (virus-free). Doporučeno je také pěstování odrůd proti viru šarky rezistentních nebo imunních (Polák, 2010). Intenzita a rychlost šíření závisí hlavně na vzdálenosti od zdroje infekce. Proto je důležité zejména u citlivějších odrůd odstraňovat z okolí výsadby napadené rostliny a možné rezervoáry viru (ÚKZÚZ, 2014).

Na území EU je zakázáno rozšiřovat nebo dovážet rostliny rodu *Prunus* infikované virem šarky. Tento předpis se týká pouze rostlin určených k pěstování, nikoliv sadby. Dovoz všech rostlin z rodu *Prunus* do EU je možný pouze z ostatních Evropských států a několika dalších zemí, například z Kádavy, USA, Egypta a Austrálie. Pro importované rostliny rodu *Prunus* které jsou k PPV náchylnější a navíc pocházejí z oblastí, kde je výskyt viru potvrzen, je stanoveno další opatření. Takové rostliny musí projít certifikačním uznávacím řízením, nebo musí být doloženo, že materiál ze kterého tyto rostliny vznikly, byl na přítomnost viru šarky testován a byl shledán viru prostým. Také je potřeba prokázat, že v bezprostředním okolí místa pěstování těchto rostlin nebyly zaznamenány žádné příznaky onemocnění šarkou.

Opatření k zamezení šíření viru šarky se vztahují i na vnitřní trh EU. Před uvedením na trh musí rostliny rodu *Prunus* projít rostlinolékařskou kontrolou, musí být vybaveny rostlinolékařským pasem a osoba, která je na trh uvádí, musí být registrovaná. Pro rostliny citlivější k PPV platí v tomto případě podobná opatření jako u rostlin dovážených (ÚKZÚZ, 2011).

## **2. 12 Rezistence**

Již zmíněnou strategií k ochraně proti viru šarky je pěstování odolných odrůd. Jednotlivé odrůdy jednoho druhu se mohou v míře rezistence neboli odolnosti značně lišit. Existují (nebo mohou být vyšlechtěny) kultivary hypersenzitivní, náchylné, tolerantní, rezistentní či imunní.

Pojmem hypersenzitivita označujeme extrémní náchylnost rostliny k virové infekci. Virem zasažené buňky rostlinného pletiva nekrotizují a odumírají. V případě že dojde pouze k lokálnímu odumření napadené tkáně, je šíření viru v rostlině zastaveno.

Náchylností rozumíme stav, kdy je virus v buňkách hostitele úspěšně množěn a vyskytuje se zde ve vysokých koncentracích. Reakcí rostliny je pak snižená produktivita i kvalita produkce, silný výskyt symptomů a deformace plodů i listů. Jedná se o přímý opak rezistence.

Buňky pletiv tolerantních odrůd obsahují také vysokou koncentraci viru, virus se zde rychle množí, avšak na rostlinu to nemá takový dopad jako v případě náchylnosti. Příznaky jsou slabé nebo vůbec žádné, kvalita plodů je dobrá.

Při rezistenci je množení viru v rostlině omezené a jeho koncentrace v pletivech je nízká. Produktivita i kvalita rostliny je pouze málo ovlivněna, příznaky se téměř nevyskytují. Na jakost plodů nemá přítomnost viru téměř žádný vliv.

Imunita nebo také absolutní odolnost znamená, že k infekci jako takové vůbec nedochází. Virus je sice v rostlině přítomen, nicméně není schopen se množit. Imunní odrůdy jsou tedy pro pěstitele ideální (Polák, 2010).

Rezistence rostlin vůči patogenům vzniká nebo je uskutečňována dvěma způsoby. Prvním z nich je přirozená, rostlině vlastní genetická rezistence, druhým způsobem je vyvolání rezistence v rostlině pomocí transgenozy (Rimbaud et al., 2015).

## **2. 12. 1 Šlechtění na rezistenci**

Šlechtění na rezistenci vůči viru šarky má za cíl vyvinout takové odrůdy peckovin, které budou splňovat požadavky jak na kvalitu, tak na kvantitu hospodářského výnosu a navíc budou odolné virové infekci. Celý proces je založen na již zmíněné přirozené rezistenci. Vychází tedy z takových informací obsažených v genomu rostliny, které mají za následek chování typu rezistence, tolerance nebo odolnosti (Polák, 2010).

Ačkoliv výzkum v oblasti šlechtění na rezistenci probíhá řadu let, bylo u komerčně pěstovaných odrůd rodu *Prunus* identifikováno jen velmi málo zdrojů rezistence. U meruněk je rezistence založena především polygenně (je řízena více geny), méně často také monogenně (řízena jedním genem s výrazným účinkem). Všechny evropské odrůdy meruněk (*P. armeniaca*) jsou k napadení viru šarky citlivé. Proto byly ke šlechtění na rezistenci využity takové odrůdy pocházející ze Severní Ameriky, u kterých byla rezistence prokázána. Například "Stark Early Orange", "Stella" a "Harlayne" (Martínez-Gómez et al., 2000). Právě uvedená odrůda

"Stark Early Orange" byla ke šlechtění použita i v České republice. Například na SŠ Valtice a ZF Lednice tak vznikla velmi odolná rezistentní odrůda "Betinka".

Šlechtění na rezistenci je méně úspěšné u slivoní (*P. domestica*). Nejvyšší kvalitnější pěstované odrůdy slivoní, v ČR je to například "Domácí švestka", jsou k infekci virem šarky velmi citlivé. Prozatím nebyla vyšlechtěna žádná rezistentní odrůda, která by se jim v jakosti vyrovnala. Neznamena to však, že se u slivoní zdroje rezistence nevyskytují. V Německu byla vyšlechtěna hypersenzitivní odrůda "Jojo", která se pěstuje i u nás. Vyhodnocování zdrojů přirozené rezistence stále probíhá. Souběžně s tímto výzkumem jsou dále šlechtěny takové hypersenzitivní odrůdy *P. domestica*, které by mohly náchylné kultivary švestky domácí substituovat (Krška et al., 2010).

Nejméně příznivá situace je však u broskvoní (*P. persica*). V současné době totiž nejsou známy žádné odrůdy, které by mohly sloužit jako zdroje rezistence k dalšímu šlechtění. Do broskvoně tak byly "vneseny" geny pro rezistenci pomocí křížení s příbuznou mandloní Davidovou (*P. davidiana*) a mandloní obecnou (*P. amygdalus*). Vznikly tak rezistentní interspecifické hybridy GF 677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) a Cadaman (*P. davidiana* x *P. persica*). Oba tyto hybridní jedinci byli dále kříženi s odrůdou broskvoně Cresthaven. Rezistence je u všech těchto kříženců prokazatelná, nicméně výsledky hodnocení jsou stále značně variabilní. Získané hybridy lze však s jistotou použít ke šlechtění podnoží. Pro přímé šlechtění nových odrůd broskvoní však musí být vzata v úvahu zhoršená kvalita ovoce, kterou zapříčinilo křížení s *P. davidiana* (Salava et al., 2013).

### 2. 12. 2 Transgenoz

Šlechtění odrůd odolných proti viru šarky je proces poměrně nákladný a zdlouhavý. Nevýhodný je také z hlediska mnoha komplikací, které mohou být zapříčiněny například polygenně založenou přirozenou rezistencí nebo faktem, že u některých druhů není žádný zdroj rezistence doposud znám. Jako řešení se tedy nabízí "dodat" rezistenci rostlinám prostřednictvím transgenoz (Zagrai et al., 2011).

První pokusy o vytvoření transgenní odolné rostliny byly založeny na konceptu "Pathogen-derived resistance" (PDR), tedy na principu od patogena odvozené rezistence. Tento způsob vyvolání rezistence spočívá v použití části genomu patogena pro navození obrany hostitelské rostliny proti patogenu samotnému (Sanford a Johnston, 1985). Nejstarší takovou metodou je tzv. "Coat-

protein-mediated resistance" (CPMR), čili ochrana zprostředkovaná plášťovým proteinem. Výsledek indukce genu pro obalový protein (CP genu) do rostliny je následující. Plášťový protein je zabudován do buněčné stěny rostliny a znemožňuje tak průchod částicím s totožným plášťovým proteinem do nitra buňky (Řepková, 2013). Rezistenci je možno v rostlině vyvolat také na základě posttranskripčního umlčování genů ("Post-transcriptional gene silencing", PTGS). Tento jev, označovaný také jako RNA interference, je součástí obranného mechanismu rostliny. Podílí se také na regulaci genové exprese. Základem celého procesu je vložená transgenní sekvence RNA viru. Z tohoto transgenu jsou pak odvozeny krátké úseky RNA, známé jako siRNA nebo miRNA. Ty jsou následně začleněny do RISC komplexu (RNA-induced silencing complexes), který pak degraduje cílovou RNA (RNA se sekvencí odpovídající vloženému virovému transgenu) (Prins et al., 2008).

Na bázi těchto dvou mechanismů došlo k vyvinutí rezistence u odrůdy "Honey Sweet" (dříve klon C5) náležející druhu *P. domestica* (Jirošová a Kumar, 2010). Tento GM kultivar slivoně byl uvolněný v roce 2011 v USA k neomezenému pěstování včetně konzumace plodů. V roce 2014 byla vydána komplexní metodika hodnocení rezistence odrůdy "Honey Sweet", která shromažďuje výsledky výzkumu, který probíhal od roku 2011 ve VÚRV Praha - Ruzyně. Nejdůležitějším závěrem této metodiky je fakt, že nedochází k rekombinacím mezi běžnými kmeny PPV a mezi homologním transkriptem švestky "Honey Sweet", ani nedochází k přenosu transgenu z GM slivoně na jiné rostliny rodu *Prunus*. Virus šarky je navíc na tuto odrůdu nepřenositelný mšicemi. Může tak být velkým přínosem pro ovocnářství u nás i v dalších evropských zemích (Polák et al., 2014).

### **3 CÍLE PRÁCE**

Prvním cílem bakalářské práce je zpracování literární rešerše, která shrnuje poznatky o vlastnostech a problematice viru šarky v současnosti. Důraz je kladen především na metody detekce viru, výzkum rezistence a šlechtění odolných odrůd.

Druhým cílem je izolace RNA z virem infikovaných hostitelů a detekce viru šarky pomocí zvolené metodiky.

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Odběr vzorků rostlinného materiálu**

Pro zpracování praktické části bakalářské práce byly využity vzorky rostlinné tkáně (listů) s viditelnými příznaky napadení virem šarky.

Sběr biologického materiálu probíhal v měsíci červnu roku 2016 v okolí obce Bavorov v jižních Čechách.

Konkrétní zvolená lokalita pro odběr vzorků se nachází na souřadnicích 49°06'47.9"N 14°04'29.0"E. Jedná se o výsadbu ovocných stromů podél cesty mezi poli.

Na stanovišti byl vybrány tři stromy slivoně švestky (*Prunus domestica*) s výraznými symptomy. Listy z těchto stromů byly vloženy do uzavíratelných plastových nádobek se stabilizačním roztokem RNALater Solution a uchovány v mrazáku při -20 °C.

### **4.2 Izolace RNA**

Pro izolaci RNA byla zvolena metoda využívající směs TRIzol. Výhodou této směsi je, že zachovává soudržnost separovaných molekul RNA, zabraňuje jejich kontaminaci proteiny a DNA a zároveň inhibuje činnost enzymů RNAs.

Postup:

1. Z listů infikovaných šarkou byly vystřiženy tři malé části s chlorotickými skvrnami. Výstřižky byly vloženy do tří mikrocentrifugačních zkumavek o objemu 1,5 ml s TRIzolem předehřátým na 60 °C. Rostlinná tkáň byla homogénizátorem rozmělněna a takto upravené vzorky se nechaly stát 5 minut při laboratorní teplotě. Zkumavky byly následně centrifugovány při 3000 rpm a 4 °C po dobu 20 minut.

2. Tekutý supernatant byl přenesen do nových zkumavek a bylo k němu přidáno 200 µl chloroformu. Směs byla 15 minut promíchávána a poté byly vzorky ponechány 10 minut v klidu při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 15 minut při 10 500 rpm a 4 °C.

3. Průhledná fáze byla přepipetována do nových zkumavek s 500 µl isopropanolu a 500 µl 1,2 M chloridu sodného. Vše bylo promícháno a po 10 minutách centrifugováno při 12 000 rpm a 4 °C 10 minut.

4. Supernatant byl znovu přenesen do čistých zkumavek a bylo k němu přidáno 100  $\mu$ l 75% ethanolu. Následovala centrifugace 5 minut (8500 rpm, 4 °C). Tento postup byl dvakrát zopakován. Takto připravené vzorky byly umístěny na 5 minut do termobloku k vysušení.

5. Po uplynutí stanovené doby bylo do zkumavek napipetováno 20  $\mu$ l DEPC-MQ a 1  $\mu$ l inhibitoru RNAs. Vzorek byl několikrát promíchán. Tím bylo dosaženo úplného rozpuštění a rozrušení. Zkumavky byly odloženy do termostatu přehřátého na 60 °C na 10 minut.

7. Hotové vzorky byly uchovány při -80 °C.

### 4.3 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je metoda užívaná k přepisu genetické informace z RNA do DNA. Informace se pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepíše z templátu RNA do vláken cDNA (complementary DNA), která slouží jakou templátová DNA k amplifikaci metodou PCR.

Postup:

1. Nejprve byla připravena reakční směs ze 6  $\mu$ l PCR vody (Nuclease free H<sub>2</sub>O) a 3  $\mu$ l oligo(dT)<sub>15</sub> primeru.

2. Do čistých zkumavek bylo napipetováno po 3  $\mu$ l vyizolované RNA a ke každému vzorku byly přidány 3  $\mu$ l reakční směsi. Takto připravené vzorky byly 5 minut zahřívány v termocykleru při teplotě 70 °C.

3. Mezitím byla podle následujícího rozpisu připravena reakční směs:

PCR voda (Nuclease free H <sub>2</sub> O)	6,6 $\mu$ l
d NTP	1 $\mu$ l
5xRxN pufr	4 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2,4 $\mu$ l
RT enzym	1 $\mu$ l

4. Směs byla promíchána a po 15  $\mu$ l rozdělena do všech tří vzorků. Reverzní transkripce proběhla v termocykleru podle nastaveného programu (5 minut při 25 °C, poté 60 minut při 42 °C).



#### 4. 4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci určité části řetězce DNA. Pro tuto metodu se využívá dvou specifických primerů, komplementárních ke koncovým sekvencím úseku DNA. Po jejich napojení na koncové sekvence se na primer dále připojí DNA polymeráza, která syntetizuje nové vlákno DNA komplementární k původnímu. Několikanásobným opakováním celého procesu je potřebný úsek DNA zmnožen do miliard kopií.

Jako templát pro PCR reakci byla použita cDNA získaná reverzní transkripcí. K přípravě reakční směsi byly využity specifické primery pro detekci viru šarky (Wetzel et al., 1991):

<b>Primer</b>	<b>Sekvence primeru (5' - 3')</b>	<b>Velikost amplikonu (bp)</b>
P1	ACCGAGACCACTACTCCC	243
P2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA	243

Postup:

1. Reakční směs pro PCR byla připravena dle následujícího rozpisu:

PPP Master Mix	10 $\mu$ l
P1	0,5 $\mu$ l
P2	0,5 $\mu$ l
PCR voda (Nuclease free H <sub>2</sub> O)	8 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l

2. PCR templát byl po 19  $\mu$ l rozpipetován do tří nových zkumavek a do každé z nich bylo přidáno po 1  $\mu$ l hotové cDNA.

3. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru. Reakce proběhla dle nastaveného programu: úvodní denaturace při 94 °C po dobu 2 minut následovaná cyklem o 40 krocích - denaturace při 94 °C 2 minuty, annealing při 60 °C 30 sekund a elongace při 72 °C po dobu 1 minuty. Konečná elongace probíhala 10 minut při 72 °C.

5. PCR produkty byly uchovány při 4 °C.

## 4. 5 Agarózová elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která se využívá k vizualizaci amplifikačních produktů PCR v porovnání s markerem. Je založena na migraci nabitých částic v elektrickém poli, přičemž se záporně nabitě částice DNA pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě.

Postup:

1. 2% agarózový gel byl připraven zahřátím 100 ml TBE pufru se 2 g agarózy. Do vychladlé směsi bylo napipetováno 4,5  $\mu$ l ethidium bromidu. Hotový gel byl nalit do formy s hřebínky a ponechán při laboratorní teplotě k zatuhnutí.

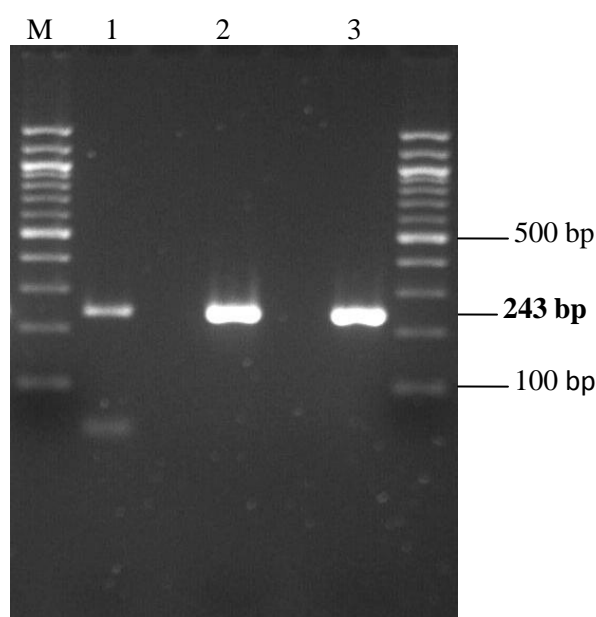
2. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetické vany, zalit TBE pufrem a do jamek bylo napipetováno po 15  $\mu$ l PCR reakce. Zároveň bylo do první a poslední jamky odpipetováno po 15  $\mu$ l 100 bp DNA Ladderu.

3. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu 90 minut. Výsledky elektroforézy byly pozorovány v UV transluminátoru.

## 5 VÝSLEDKY

Cílem praktické části práce bylo ověřit vhodnost zvolené metodiky, která by identifikovala virus šarky v rostlinném materiálu. Základními metodami byla izolace RNA za pomoci směsi TRIzol a PCR s využitím specifických primerů pro detekci viru šarky.

Z rostlinného pletiva s viditelnými příznaky napadení virem šarky se podařilo izolovat RNA viru, která následně sloužila jako templát pro syntézu cDNA. cDNA získaná reverzní transkripcí byla použita jako templátové vlákno DNA pro PCR reakci.



Obr. 6: Vizualizace amplifikačních produktů PCR v porovnání s markerem (M).

Použitím specifických primerů P1 a P2 byly získány amplikony o velikosti 243 bp, což je také patrné z obrázku 6, kde jsou produkty PCR srovnány s velikostním 100 bp markerem. Využití zmíněných primerů tedy potvrdilo přítomnost viru šarky v rostlinném materiálu.

## 6 DISKUZE

Molekulárně-biologické metody, založené na izolaci virové nukleové kyseliny, jsou dnes běžně využívány k detekci virových patogenů v rostlinném materiálu. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2. 10, jejich největší předností je nepochybně přesnost a velká citlivost.

Exaktnost těchto metod byla nesčetněkrát prokázána a potvrzena mnoha pracemi a výzkumy. I přesto nemusíme jejich použitím vždy dosáhnout pozitivního výsledku. Úspěšnost experimentu nezávisí jen na kvalitě provedení jednotlivých kroků postupu, ale je také významně ovlivněna použitým pokusným materiálem.

Vzorky rostlinné tkáně by ideálně měly být odebírány v průběhu měsíce května a června. V tomto období je intenzita projevu symptomů nejvyšší, protože v této době má virus přítomný v rostlinném pletivu vysokou replikační aktivitu. Identifikace viru je samozřejmě možná i ve vzorku odebraného v zimních měsících. V tomto případě je však nutné použít specifitější detekční metody, jelikož se v zimě aktivita viru v rostlině značně snižuje (Šubr a Glasa, 2008). Z toho důvodu byly listy *P. domestica* s viditelnými příznaky viru šarky, které jsem použila pro experimentální část práce, odebírány v červnu.

Výskyt symptomů na listech či jiných částech rostliny však nemusí nutně znamenat přítomnost viru v rostlinné tkáni. Z místa primární infekce se po replikaci genomu šíří virus šarky dál do distálních částí rostliny. Virové částice nejprve prostupují z jedné buňky do druhé prostřednictvím plasmodesmat. Z lokálně napadených buněk se poté virus na "delší vzdálenosti šíří pomocí floemu (Revers et al., 1999). S postupným pronikáním viru do různých částí rostliny souvisí i postupné objevování příznaků napadení. Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, virus ovlivňuje strukturu chloroplastů a tím dochází ke snížení koncentrace chlorofylu ve virem napadených místech (Nagyová et al., 2012). Tyto změny jsou nevratné. Proto tedy mohou symptomy na rostlině přetrvávat, ačkoliv se již virus přemístil do jiných vzdálenějších částí rostliny (Ferri Bodin et al., 2002). Vzorky je tedy nejvhodnější odebírat z mladších listů napadených stromů, jelikož je zde nejpravděpodobnější nevyšší koncentrace virových částic. Titr viru v rostlinné tkáni může být dále ovlivněn zdravotním stavem hostitele nebo přítomností jiných virových chorob či patogenních organizmů (Šubr a Glasa, 2008).

Úspěšnost izolace RNA viru šarky může být ovlivněna jak výše uvedenými skutečnostmi, tak použitím konkrétních reagensů pro samotnou separaci nukleové kyseliny. Ačkoliv je v současné době pro izolaci virové RNA dostupná řada komerčních kitů, byla pro praktickou část využita metoda na základě reakční směsi TRIzol. Kladné výsledky využití této látky pro izolaci RNA viru šarky uvádějí ve svých pracích Simón-Mateo a García (2005) nebo Raghupathy et al. (2006).

Přítomnost viru šarky ve vzorcích rostlinného materiálu a tedy i vhodnost metody izolace virové RNA byla ověřena po vizualizaci amplifikačních produktů RT-PCR na agarózovém gelu. Získání amplikonů o velikosti 243 bp bylo zajištěno využitím specifických primerů P1 a P2 podle Wetzela et al., 1991. Spolehlivost zmíněných primerů potvrzují i pozitivní výsledky práce Briciu et al. (2010) a Petrova a Stoeva (2011), kteří taktéž uvádějí velikost amplifikačních produktů PCR 243 bp. Použití primerů P1 a P2 jakožto univerzálních pro identifikaci viru šarky doporučuje i Evropská organizace pro ochranu rostlin EPPO ve svém diagnostickém protokolu pro PPV (Normes OEPP EPPO Standards, 2004). S tímto označením se ztotožňují i Šubr a Glasa (2008). Navíc však uvádějí, že ačkoliv mohou primery P1 a P2 detekovat jakýkoliv kmen viru šarky, nejsou již schopné kmene od sebe rozeznat. Pro určení konkrétní kmenové varianty viru šarky se tedy používají primery specifitější, často však na bázi primerů P1 a P2. Takto byl například detekován nejnovější kmen viru šarky, PPV-Tat izoláty (Chirkov et al., 2017).

## 7 ZÁVĚR

V úvodní části práce byl zpracován literární přehled shrnující poznatky o vlastnostech, metodách detekce a možnostech ochrany proti viru šarky.

Pro detekci viru šarky v rostlinném materiálu byly zvoleny metody pracující s izolovanou virovou RNA. Přítomnost viru šarky ve vzorcích infikované tkáně listu slivoně švestky (*Prunus domestica*) byla prokázána na základě provedené RT-PCR a následnou vizualizací amplifikačních produktů na agarózovém gelu. Kladné výsledky potvrzují vhodnost zvolené metodiky pro identifikaci viru šarky.

RT-PCR je poměrně univerzální metodou pro detekci rostlinných RNA virů. V případě viru šarky se zde nabízí celá řada cílů pro další výzkum. Použitím primerů specifických pro konkrétní kmen viru by například mohl být prokázán jeho výskyt v konkrétní vybrané lokalitě či na území jižních Čech.

Izolace RNA pomocí reakční směsi TRIzol zajišťuje poměrně velké množství čisté a kvalitní nukleové kyseliny. Na základě ověřené citlivosti této metody by mohla být uvedená metodika použita i pro detekci viru šarky v rostlinách, na kterých nejsou zjevné příznaky napadení, ale nacházejí se v blízkosti infikovaných kultur. Získané výsledky by mohly být přínosem v ochraně a prevenci proti chorobě šarky.

## 8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Brault V., Uzest M., Monsion B., Jacquot E., Blanc S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes rendus - Biologies*, 333: 524 - 538.

Briciu A. C., Pamfil D., Zagrai I., Briciu D., Petricele I., Curticiu D., Taoutaou A. (2010). Comparison of RT-PCR and PCR-RFLP molecular techniques used for the differentiation of isolates belonging to D and M strains of Plum pox virus collected from Cluj region. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67: 359 - 363.

Burns, R. (2010). Immunochemical techniques. In: Wilson K., Walker J. (eds). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th ed. Cambridge: Cambridge University Press, s. 263 - 299.

Candresse T., Cambra M. (2006). Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains. *EPPO Bulletin*, 36: 239 - 246.

Cui H., Wang A. (2016). The Plum Pox Virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early infection stage. *Journal of Virology*, 90: 5119-5131.

Crowther J. R. (2001). *The ELISA guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, s. 421.

Damsteegt V. D., Waterworth H. E., Mink G. I., Howell W. E., Levy L. (1997). *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of Plum pox virus and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329 - 332.

Damsteegt V. D., Scorza R., Stone A. L., Schneider W. L., Webb K., Demuth M., Gildow F. E. (2007). *Prunus* host range of Plum pox virus (PPV) in the United states by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18 - 23.

Delano J., Varga A., Sanderson D. (2013). Genetic diversity of Plum pox virus: strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35: 431 - 441.

Ferri Bodin M., Costes E., Quiot J.-B., Dosba F. (2002). Systemic spread of Plum pox virus (PPV) in Mariana plum GF8-1 in relation to shoot growth. *Plant Pathology*, 51: 142 - 148.

Glasa M., Candresse T. (2008). Plum pox virus. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. H. V. (eds). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2010. s. 280 - 284.

Glasa M. (2010). Biologická a genetická diverzita vírusu šarky slivky. In: Polák J. et al. *Šarka peckovin - současný stav v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i. s. 23 - 27.

Glasa M., Prikhodko Y., Predajňa L., Nagyová A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Šubr Z., Cambra M., Candresse T. (2013). Characterization of sour cherry isolates of Plum pox virus from the Volga Basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103: 972 - 979.

García J. A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. (2014). Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15: 226 - 241.

Hare K., Nazeer A., Brij Lal A., Akilesh K., Pragya R., Jitendra K., R. (2012). Sharka in plums: diagnostic and management. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45: 170 - 191.

Hull R. (2009). *Comparative plant virology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, s. 139 - 147., s. 245 - 268., s. 285 - 301.

Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A. (2013). Detection and partial molecular characterization of atypical plum pox virus isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158: 1383 - 1387.



Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Zakubanskiy A., Osipov G. (2017). New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 52 - 56.

James D., Glasa M. (2006). Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with Plum pox virus characterization. *EPPO Bulletin*, 36: 247 - 250.

Jarošová J., Polák J., Kumar J. (2008). *Metodika molekulární detekce virů peckovin pomocí RT-PCR a multiplex-RT-PCR*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., s. 26.

Jarošová J., Kumar J. (2010). Metody genového inženýrství v ochraně proti šarce. . In: Polák J. et al. *Šarka peckovin - současný stav v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i. s. 48 - 55.

King A. M. Q. , Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (eds). (2012). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press, s. 1069.

Krška B., Vachůn Z., Nečas T., Ondrášek I., Salava J., Polák J. (2010). Šlechtění meruněk na resistenci k PPV v ČR a v Evropě, nové směry - molekulární markery. In: Polák J. et al. *Šarka peckovin - současný stav v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i. s. 37 - 47.

López-Moya J. J., Fernández-Fernández M. R., Cambra M., García J. A. (2000). Biotechnological aspects of Plum pox virus. *Journal of Biotechnology*, 76: 121- 136.

Lowery D. T., Vickers P. M., Bittner L. A., Stobbs L. W., Footitt R. G. (2015). Aphid transmission of the Ontario isolate of Plum pox virus. *Journal of Economic Entomology*, 108: 2168 - 2173.

Martínez-Gómez P., Dicenta F., Audergon J. M. (2000). Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca L.*) cultivars in the presence of sharka (Plum pox potyvirus): a review. *Agronomie*, 20: 407 - 422.

Nagyová A., Kamencayová M., Glasa M., Šubr Z. (2012). The 3'-proximal part of the Plum pox virus P1 gene determinates the symptom expression in two herbaceous host plants. *Virus Genes*, 44: 505 - 512.

Normes OEPP EPPO Standards: Diagnostic protocols for regulated pests (2004). *EPPO Bulletin*, 34: 115 - 157.

Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53: 1-5.

Olmos A., Bertolini E., Cambra M. (2002). Simultaneous and Co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51 - 59.

Petrov N., Stoev A. (2011). Almond (*Prunus dulcis*) as a host of Plum pox virus. *Acta Horticulturae*, 899: 73 - 78.

Plum pox virus distribution. (2017). *EPPO Global Database*.

Polák J. (2006). Hosts and symptoms of Plum pox virus: woody species other than fruit and ornamental species of *Prunus*. *EPPO Bulletin*, 36: 225 - 226.

Polák J. (2010). Šarka švestky – historie choroby v ČR, Evropě a ve světě, virus šarky švestky, jeho vlastnosti, hostitelský okruh, přenos, šíření, epidemiologie, škodlivost a metody ochrany, mezinárodní projekt SharCo 7. RP EU. In: Polák J. et al. *Šarka peckovin - současný stav v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i., s. 12 - 20.

Polák J., Kumar J., Krška B., Komínek P. Jarošová J. (2014). *Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, Prunus domestica L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. Prunus*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., s. 36.

Polák J., Komínek P. (2016). Investigation on the incidence of Plum pox virus in fruit nurseries of the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 52: 158 - 163.

Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, 9: 73 - 83.

Raghupathy M. B., Griffiths J. S., Stobbs L. W., Brown D. C., Brandle J. E., Wang A. (2006). Transfection of *Arabidopsis* protoplasts with a Plum pox virus (PPV) infectious clone for studying early molecular events associated with PPV infection. *Journal of Virological Methods*, 136: 147 - 153.

Revers F., Le Gall O., Candresse T., Maule A. J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/*Potyvirus* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12: 367 - 376.

Rimbaud L., Dallot S., Gottwald T., Decroocq V., Jacquot E., Soubeyrand S., Thebaud G. (2015). Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants. *Annual Review of Phytopathology*, 53: 357 - 378.

Roy A. S., Smith I. M. (1994). Plum pox situation in Europe. *EPPO Bulletin*, 24: 515 - 523.

Řepková J. (2013). *Genetika rostlin*. Brno: Masarykova univerzita. s. 189.

Salava J., Polák J., Oukropec I. (2013). Evaluation of the *Prunus* interspecific progenies for resistance to Plum Pox Virus. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49: 65 - 69.

Sanford J. C., Johnston S. A. (1985). The concept of parasite-derived resistance - deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical biology*, 113: 395 - 405.

Simón-Mateo C., García J. A. (2005). MicroRNA-guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology*, 80: 2429 - 2436.

Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. (2012). Sharka: The past, the present and the future. *Viruses*, 4: 2853 - 2091.

Špak J. (2011). *Diagnostika rostlinných virů: studijní text ke kurzu EKOTECH*. České Budějovice: BC AV ČR, v. v. i., s. 43

Šubr Z., Glasa M. (2008). Plum pox virus variability detected by the advanced analytical methods. *Acta Virologica*, 52: 75 - 90.

Šubr Z., Glasa M. (2013). Unfolding the secrets of Plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virologica*, 57: 217 - 228.

Taiyun W., Changwei Z., Jian H., Ruyi X., Kasschau K. D., Xueping Z., Carrington J. C. Wang A. (2010). Formation of complexes at plasmodesmata for Potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*, 6: 1 - 12.

Metodika IOR: *Virové neštovice peckovin*. (2014). Rostlinolékařský portál, ÚKZÚZ.

Virus šarky švestky. (2011). ÚKZÚZ, Ministerstvo zemědělství, s. 4.

Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Dunez J. (1991). A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355 - 365.

Zagrai I., Ravelonandro M., Gaboreanu I., Ferencz B., Scorza R., Zagrai L., Kelemen B., Pamfil D., Popescu O. (2011). Transgenic plums expressing Plum pox virus coat protein gene do not assist the development of virus recombinants under field conditions. *Journal of Plant Pathology*, 93: 159 - 165.