

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Detekce virů pícnin pomocí DAS-ELISA

Bakalářská práce

Tereza Tomková

Vedoucí práce: Dr., Ing. Jana Fránová

České Budějovice 2014

Tomková, T., 2014: Detekce virů pícnin pomocí DAS-ELISA. [Detection of forage viruses by DAS-ELISA. Bc. Thesis, in Czech.]- 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The subject of this bachelor thesis is screening of viruses on – wild and cultivated forage crop – growing in the Czech Republic. Two viruses – *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV; genus *Carlavirus*) and *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV; genus *Potexvirus*) – were screened using the DAS-ELISA. Three plants of *Trifolium pratense* (variety Amos, Blizard and Rezista) were found to be infected with RCVMV, while any plant infected by CIYMV was not identified.

Tato bakalářská práce byla financována projektem VĚDRO a částečně Katedrou genetiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených pramenů a literatury.

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 archivované Přírodovědeckou 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 dne 24. 4. 2014

.....
Tereza Tomková

Poděkování

Děkuji Dr., Ing. Janě Fránové za možnost vypracování bakalářské práce právě pod jejím vedením, za její ochotu a odborné rady. Dále děkuji laborantce Janě Rakouské za asistenci a pomoc při práci v laboratoři a svému kolegovi Jiřímu Kyslíkovi.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1 Viry infikující pícniny v Evropě	3
2.2 <i>Clover yellow mosaic virus</i>	5
2.3 <i>Red clover vein mosaic virus</i>	6
2.4 DAS-ELISA	9
3. Cíle práce	10
4. Metodika práce	11
4.1 Materiál	11
4.2 Metody	11
4.2.1 Detekce <i>Red clover vein mosaic virus</i> pomocí DAS-ELISA	11
4.2.2 Detekce <i>Clover yellow mosaic virus</i> pomocí DAS-ELISA	13
4.2.3 Hodnocení příznaků	13
4.3 Složení pufrů	13
5. Výsledky	15
5.1 <i>Red clover vein mosaic virus</i>	15
5.2 <i>Clover yellow mosaic virus</i>	20
6. Diskuze	23
7. Závěr	25
8. Přílohy	26
8.1 Graf	26
8.2 Obrázky	27
9. Zdroje	31

Seznam použitých zkratek

AMV	– <i>Alfalfa mosaic virus</i>
AP	– alkaline phosphatase
BWYV	– <i>Beet western yellows virus</i>
BYMV	– <i>Bean yellow mosaic virus</i>
CIYMV	– <i>Clover yellow mosaic virus</i>
CIYVV	– <i>Clover yellow vein virus</i>
CMV	– <i>Cucumber mosaic virus</i>
DAS-ELISA	– Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
DNA	– deoxyribonucleic acid
dsDNA/ RNA	– double-stranded DNA/ RNA
DSMZ	– Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
gRNA	– genomic RNA
HRP	– Horseredish peroxidase
ORF	– open reading frame
RCMV	– <i>Red clover mottle virus</i>
RCVMV	– <i>Red clover vein mosaic virus</i>
RNA	– ribonucleic acid
ssDNA/ RNA	– single-stranded DNA/ RNA
WCIMV	– <i>White clover mosaic virus</i>

1. Úvod

Virus – slovo pocházející z latiny originálně znamenající jed, slizký výměšek, hnis a také nechutný zápach – bylo vypůjčeno k popsání nakažlivých subjektů, které se vyvíjí v jedincích vystavených nepříznivým podmínkám. Věřilo se, že nežádoucí podmínky narušují rovnováhu existující u zdravého individua a tím vedou ke vzniku infekčních subjektů (Khan a Dijkstra, 2006). Pojmenování i charakteristika virů v odborné literatuře se v čase značně měnily. Například za Luise Pasteura se věřilo, že viry jsou jakousi čeledí mimořádně malých bakterií (Borecký, 1983).

Zejména díky nástupu modernějších metod bylo umožněno popsání virů v dnešním slova smyslu. V současné době jsou viry popisovány jako nebuněčné (acelulární) mikroorganismy, které vyžadují pro své rozmnožování citlivé hostitelské buňky jiných organismů – jsou obligátními intracelulárními parazity, jež jsou plně odkázáni na metabolismus svého hostitele (Klaban, 1999). Jedná se o řetězec jedné nebo více molekul nukleové kyseliny (DNA či RNA), uzavřený obvykle v proteinovém obalu (Hull, 2009).

Především možnost pozorování virových částic v elektronovém mikroskopu patřila mezi první kroky na cestě vedoucí k izolaci virů z jejich hostitelů umožňující studování a charakterizování těchto mikroorganismů v laboratorních podmínkách. Úspěchy v této oblasti vedly ke vzniku virologie jako vědního oboru (Bos, 1999). Nyní je virologie popisována jako obor, jehož náplní je studium virů včetně bakteriofágů, ale také viroidů a v některých případech i prionů (Klaban, 1999). Rostlinná virologie je pak podoborem virologie obecné a zabývá se studiem zmíněných subjektů působících na rostliny. V současné době spadá pod tento obor také studium dalších molekulárních patogenů rostlin, například fytoplazem (www.umbr.cas.cz).

Prvním virem, který byl kdy studován, byl rostlinný virus mozaiky tabáku (*Tobacco mosaic virus*). Ukázalo se, že se jedná o velice stabilní virus, který je relativně snadno přenášen, a že dosahuje v infikované rostlině vysokých koncentrací (Khan a Dijkstra, 2006).

Rostlinné viry patří mezi významné patogenní činitele u rostlin a byly popsány již nesčetné choroby, které způsobují. Symptomy infikovaných rostlin mají velmi široký rozsah (mozaika listů, žloutnutí, více či méně rozsáhlá nekróza listů, větví, kořenů, hlíz či cibulek, poškození normálního růstu rostliny a mnohé další) a velmi často dochází k propojení mezi vnitřními a vnějšími symptomy (Khan a Dijkstra, 2006). Pro člověka je podstatné především to, že mnohé viry napadají kulturní plodiny a často způsobují ekonomicky významné ztráty. Uvádí se, že každá plodina pěstovaná člověkem je hostitelem minimálně jednoho druhu rostlinného viru (Hull, 2009). Rostlinné viry mohou být přenášeny několika možnými

způsoby a mnohé z nich jsou velice efektivní. V důsledku toho pak mohou vznikat až epidemie některých virových onemocnění (Khan a Dijkstra, 2006). Nositelem genetické informace rostlinných virů (a virů obecně) je buď DNA či RNA a na základě tohoto faktu můžeme viry dělit do dvou kategorií – DNA viry a RNA viry (Borecký, 1983). Bylo prokázáno, že největší počet rostlinných virů obsahuje ssRNA, ale vyskytují se i celé rody či jednotlivé druhy obsahující dsRNA (např. *Wound tumor virus*), ssDNA (např. geminiviry) a dsDNA (např. *Cauliflower mosaic virus*). V roce 1962 byl objeven a také popsán fenomén rostlinných virů v angličtině nazývaný „satelitism“ (odtud český název satelitní viry). Jedná se o viry, které vyžadují k replikaci kromě hostitelské buňky také přítomnost jiného viru jako nezbytného pomocníka (Khan a Dijkstra, 2006).

2. Literární přehled

2.1 Viry infikující pícniny v Evropě

Pro literární část bakalářské práce byly vybrány viry, které se nejčastěji vyskytují na území Evropy a pro něž jsou dostupná antiséra: *Alfalfa mosaic virus* (AMV; čeleď *Bromoviridae*, rod *Alfamovirus*), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV; čeleď *Potyviridae*, rod *Potyvirus*), *Beet western yellows virus* (BWYV; čeleď *Luteoviridae*, rod *Poleovirus*), *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV; čeleď *Alphaflexiviridae*, rod *Potexvirus*), *Clover yellow vein virus* (CIYVV; čeleď *Potyviridae*, rod *Potyvirus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV; čeleď *Bromoviridae*, rod *Cucumovirus*), *Red clover mottle virus* (RCMV; čeleď *Secoviridae*, rod *Comovirus*), *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV; čeleď *Betaflexiviridae*, rod *Carlavirus*) a *White clover mosaic virus* (WCIMV; čeleď *Alphaflexiviridae*, rod *Potexvirus*). Výjimkou je *Clover yellow mosaic virus*, jehož výskyt byl v Evropě prozatím potvrzen jen ve dvou případech – na rodu sporýš (*Verbena*) v UK (Mumford a kol., 2005) a v České republice, a to na jeteli lučním (*Trifolium pratense*) (Fránová a kol. 2011; 2012). Charakteristika virů vybraných pro literární část bakalářské práce je shrnuta v Tab. I.

Tab. I: Taxonomie, symptomy, výskyt a popis částic *Alfalfa mosaic virus*, *Bean yellow mosaic virus*, *Beet western yellows virus*, *Clover yellow vein virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Red clover mottle virus* a *White clover mosaic virus*.

Druh rostlinného viru	Taxonomie ¹⁾	Symptomy	Výskyt	Částice
<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	Čeleď: <i>Bromoviridae</i> Rod: <i>Alfavirus</i>	Mozaika listů ¹⁾ Skvrnitost listů ^{1) 2)} Malformace ¹⁾ Zakrnělost ¹⁾	Celosvětový ¹⁾	Tři druhy částic ⁷⁾ : Bottom (B) – 58x18 nm ¹⁾ Middle (M) – 49x18 nm ¹⁾ Top b (Tb) – 38x18 nm ¹⁾
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	Čeleď: <i>Potyviridae</i> Rod: <i>Potyvirus</i>	Mozaika listů ¹⁾ Apikální nekrózy ¹⁾ Pruhování listů ¹⁾	Celosvětový ¹⁾	Flexibilní vlákna ⁸⁾ 750x15 nm ⁸⁾
<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	Čeleď: <i>Luteoviridae</i> Rod: <i>Polerovirus</i>	Žloutnutí listů ³⁾ Chlorózy ¹⁾ Pruhování listů ¹⁾	Evropa ¹⁾ Kanada ¹⁾ USA ¹⁾ Asie ¹⁾	Izometrické ⁹⁾ Průměr – 26 nm ⁹⁾
<i>Clover yellow vein virus</i> (CIYVV)	Čeleď: <i>Potyviridae</i> Rod: <i>Potyvirus</i>	Nekrózy ⁵⁾ Skvrnitost listů ¹⁾ Žloutnutí listů ¹⁾ Mozaika listů ¹⁾	Evropa ¹⁾ Kanada ¹⁾ USA ¹⁾ Nový Zéland ⁵⁾ Austrálie ⁶⁾	Flexibilní vlákna ¹⁰⁾ 767x12 nm ¹¹⁾
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Čeleď: <i>Bromoviridae</i> Rod: <i>Cucumovirus</i>	Žloutnutí listů ⁴⁾ Zakrnělost ⁴⁾ Mozaika listů ¹⁾	Celosvětový ¹⁾	Izometrické ¹²⁾ Průměr – 30 nm ¹²⁾
<i>Red clover mottle virus</i> (RCMV)	Čeleď: <i>Secoviridae</i> Rod: <i>Comovirus</i>	Skvrnitost listů ¹⁾	Evropa ¹⁾ USA ¹⁾ Kanada ¹⁾ Nový Zéland ¹⁾	Izometrické ¹⁾ Průměr – 30 nm ¹⁾
<i>White clover mosaic virus</i> (WCIMV)	Čeleď: <i>Alphaflexiviridae</i> Rod: <i>Potexvirus</i>	Mozaika listů ¹⁾ Skvrnitost listů ¹⁾	Evropa ¹⁾ Kanada ¹⁾ USA ¹⁾ Nový Zéland ¹⁾	Flexibilní vlákna ¹³⁾ 480x13 nm ¹³⁾

Zdroje informací: ¹⁾ www.dpvweb.net, ²⁾ Lochart a kol., 2013, ³⁾ Xiang a kol., 2008, ⁴⁾ Tomlison a kol., 2008, ⁵⁾ Foster a Musgrave, 1985, ⁶⁾ Norton a Johnstone, 1998, ⁷⁾ Gibbs a kol., 1963, ⁸⁾ Brandes a Quantz, 1955, ⁹⁾ Esau a Hoefert, 1972, ¹⁰⁾ Gibbs a kol., 1966, ¹¹⁾ Hollings a Nariani, 1965, ¹²⁾ Francki a Hatta, 1980, ¹³⁾ Brandes, 1964.

2.2 Clover yellow mosaic virus

Základní informace

Clover yellow mosaic virus (CIYMV; čeleď *Alphaflexiviridae*, rod *Potexvirus*) byl poprvé popsán v roce 1942 (Johnson, 1942) a následně pak v roce 1961 (Pratt, 1961). Tento druh viru se vyskytuje především na jetelovinách, ale i některých dalších rostlinách – hledík větší (*Antirrhium majus*), merlík bílý (*Chenopodium amaranticolor*), okurka setá (*Cucumis sativus*), pestrovka kulovitá (*Gomphrena globosa*), špenát setý (*Spinacia oleracea*), ptačinec prostřední (*Stellaria media*) (Johnson, 1942; Pratt, 1961). K diagnostickým účelům jsou pak využívány druhy bob obecný (*Vicia faba*) a hrách setý (*Pisum sativum*). CIYMV se často vyskytuje v komplexu s *White clover mosaic virus* (WCIMV; čeleď *Alphaflexiviridae*, rod *Potexvirus*). Tepelný bod inaktivace viru v homogenátu nastává mezi 58 °C a 62 °C. Infekčnost homogenátu *in vitro* skladovaného při teplotě cca. 4 °C razantně klesá mezi 6. a 12. měsícem (některé izoláty však zůstávají infekční po značně delší dobu) (Pratt, 1961).

Symptomy

U jetele lučního může infekce tímto virem způsobovat některé z následujících symptomů – žluté či světle zelené pruhování listů, zakrtnění či zakřivení listů, snížení odolnosti vůči chladu, snížení výnosů rostliny (Pratt, 1961).

Geografická distribuce

CIYMV je rozšířen především v USA a Kanadě (Pratt, 1961). Výskyt v Evropě prozatím není potvrzený, CIYMV byl nalezen pouze ve dvou případech, a to v UK na rodu sporýš (*Verbena*) (Mumford a kol., 2005) a v ČR na jeteli lučním (Fránová a kol., 2011; 2012).

Kmeny

Nejsou známy žádné speciální kmeny tohoto druhu viru, byly však nalezené izoláty s nepatrně odlišnými sérologickými vlastnostmi a symptomy, které vykazují infikované rostliny (Pratt, 1961).

Přenos

Testy přenosu CIYMV pomocí několika druhů mšic jako vektorů nepotvrdily, že by byl tento způsob přenosu možný (Johnson, 1942; Pratt, 1961). U hrachu setého byl prokázán

přenos semenem (Hampton, 1963). Experimentálně je virus přenosný mechanickou inokulací (www.dpvweb.net).

Částice

Částice CIYMV jsou flexibilní vlákna o délce 593 nm (Bercks a Brandes, 1963). Při centrifugaci sedimentují jednotlivě, hodnota sedimentačního koeficientu činí 121 S (Pratt a Reichmann, 1961). Genetická informace CIYMV je zakódována v single-stranded RNA (Koenig, 1971) a poly(A) 3' konec i 5' konec (7-methylguanosinová čepička) mají variabilní délku (AbouHaidar, 1983).

Organizace genomu

V roce 1990 byla publikována kompletní nukleotidová sekvence a organizace genomu CIYMV (izolát z bobu obecného; Kanada). Sekvenování bylo provedeno enzymatickou Sangerovo metodou (Sanger a kol., 1977) a také chemickou Maxam-Gilbertovo metodou (Maxam a Gilbert, 1980). Sekvenováním bylo zjištěno, že genom tohoto druhu viru tvoří 7015 nukleotidů nepočítaje 3'poly(A) konec (Sit a kol., 1990), jehož velikost se pohybuje mezi 75 a 100 nukleotidy (AbouHaidar, 1983). Genom se skládá ze šesti otevřených čtecích rámců. Obalový protein CIYMV je kódován v rámci ORF 5. Proteiny, které jsou kódované ORF 1, ORF 2, ORF 3 a ORF 5, vykazují silnou homologii s ostatními členy rodu *Potexvirus*, zejména pak s druhem *Papaya mosaic virus*. Genomová RNA CIYMV je největší z grRNA členů rodu *Potexvirus*, jejichž genom byl sekvenován (Sit a kol., 1990).

2.3 Red clover vein mosaic virus

Základní informace

Red clover vein mosaic virus (RCVMV; čeleď *Betaflexiviridae*, rod *Carlavirus*) byl poprvé popsán v roce 1937 ve Spojených státech amerických, a to na jeteli lučním (Osborn, 1937) a později byl tento virus označen jako „*Trifolium virus*“ (Weiss, 1939). O dvacet let později byl tento druh nalezen na mnohých planě rostoucích i člověkem pěstovaných luštěninách – jako například hrách setý a bob obecný a dále pak např. na hrachoru vonném (*Lathyrus odoratus*) (Sander, 1959). Koncem 90. let byl virus nalezen na dalších rostlinách – cizrna beraní (*Cicer arietinum*) (Larsen a kol., 1997) a čočka jedlá (*Lens culinaris*) (Larsen a Myers, 1998). V současné době je známý okruh hostitelů tohoto viru, který je relativně

široký a který zahrnuje čeledi *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae* a *Solanaceae*. Obecně se tento druh viru vyskytuje především na luštěninách (www.dpvweb.net). RCVMV je dobrý imunogen. Ultrafialové záření jej inaktivuje (Varma a kol., 1970).

Symptomy

Jetel luční infikovaný RCVMV může vykazovat některé z následujících symptomů – mozaika listů, zakrnění celé rostliny, pruhování (www.dpvweb.net). U luštěnin (např. hrachu setého) může infekce tímto virem vyvolat odlišné symptomy – chloróza žilek, úbytek listových žilek, proliferace axilárních pupenů a snížení apikální dominance. U některých mladých rostlin (např. u cizrny beraní a čočky jedlé) může virus způsobit úhyn celé rostliny (Graves a Hagedorn, 1956; Hagedorn, 1949). Jednotlivé symptomy jsou tedy druhově specifické.

Geografická distribuce

Asi dvě desetiletí po objevu RCVMV na území Spojených států amerických se začaly množit objevy dalších rostlin, tentokrát na území Evropy, které vykazovaly obdobné symptomy jako rostliny infikované tímto virem. Virus byl objeven ve Finsku (Jamalainen, 1957), na území dnešní Ukrajiny (Matsulevich, 1957), v Nizozemí, Švýcarsku, Velké Británii, Švédsku (Hagedorn, 1958), na území bývalého Východního Německa (Quantz, 1958) a v Polsku (Kochman a Stachyra, 1958). Dnes se uvádí hojné rozšíření RCVMV především v rámci Evropy, Severní Ameriky a jižní Afriky (www.dpvweb.net)

Kmeny

Byly nalezeny pouze minoritně zastoupené odlišné varianty – například kmen P42, který se od běžně se vyskytující formy liší v tvorbě pruhů u infikovaných rostlin hrachu setého a bobu obecného a který je latentní u jetele lučního (Zaumeyer a kol., 1964). Také byly objeveny izoláty infikující merlík bílý a další izoláty, jež ho neinfikují (Gibbs a kol., 1966). Ve Wisconsinu byla na základě odlišné náchylnosti různých kultivarů k infekci RCVMV (Hanson a Hagedorn, 1961) testována dědičnost rezistence jetele lučního vůči izolátu PV 110 a bylo zjištěno, že za tuto rezistenci je zodpovědný jediný gen a že znak je děděn úplně dominantně – štěpné poměry v F₁, BC a F₂ generaci po křížení rezistentních a náchylných kultivarů odpovídaly této skutečnosti (Khan a kol., 1977).

Přenos

Byl prokázán přenos RCVMV pomocí několika druhů mšic, a to *Acyrtosiphon pisum*, *Therioaphis ononidis*, *Myzus persicae* (Graves a Hagedorn, 1956), *Aphis fabae*, *Cavariella aegopodii*, *Cavariella theobaldi*, *Myzocallis ononidis*, *Myzus persicae* a *Therioaphis maculate* (Weber a Hampton, 1980; Edwardson a Christie, 1991). Nejběžnějším vektorem je mšice *Acyrtosiphon pisum* (Hagedorn, 1949; Graves a Hagedorn, 1956). Přenos pomocí semen byl prokázán u jetele lučního (Matsulevich, 1957), bobu obecného (Sander, 1959) a hrachu setého (Kraft a kol., 1998).

Částice

Částice RCVMV jsou rovná či nepatrně zakřivená vlákna široká cca. 12,5 nm a dlouhá 645 nm (v závislosti na způsobu preparace a hostitelské rostlině, ze které byl virus izolován). Výjimečně byly nalezeny shluky virových částic obklopených membránou. Částice sedimentují jednotlivě, sedimentační koeficient závisí na koncentraci viru a také na množství nečistot v preparátu a má hodnotu 160 S. RCVMV obsahuje ssRNA, která představuje asi 6,25 % hmotnosti částic viru, proteiny tedy zaujímají cca. 93,75 % hmotnosti částic (procentuální zastoupení lipidů a cukrů je nulové). Zastoupení jednotlivých nukleotidů je G 31, A 24, C 23 a U 22 (Varma a kol., 1970).

Organizace genomu

V roce 2009 byla zjištěna kompletní nukleotidová sekvence a organizace genomu RCVMV (izolát z cizrný beraní, USA). Sekvenování bylo provedeno ve washingtonské Laboratory for Biotechnology and Bioanalysis, a to Sangerovo metodou (Sanger a kol., 1977). Kompletní nukleotidová sekvence RCVMV ukázala, že genom tohoto viru tvoří 8 604 nukleotidů a že se skládá ze šesti otevřených čtecích rámců, stejně jako je tomu u ostatních členů rodu *Carlavirus*. Fylogenetickou analýzou, při níž byla zkoumána aminokyselinová sekvence ORF 1 (replicase genes) a ORF 5 (coat protein), bylo zjištěno, že podle aminokyselinové sekvence ORF 1 je RCVMV nejvíce příbuzný *Garlic latent virus* (GarLV), dále pak *Coleus vein necrosis virus* (CVNV) a v menší míře *Poplar mosaic virus* (PopMV) a *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV). Podle analýzy aminokyselinové sekvence obalového proteinu je ale RCVMV nejpříbuznější *Pea streak virus* (PeSV). Zajímavé je, že RCVMV je jen vzdáleně příbuzný *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV), který je významným virem luštěnin. Tento fakt je přisuzován odlišným druhům vektorů, které viry přenášejí (Larsen a kol., 2009).

2.4 DAS-ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), někdy také nazývaná EIA (Enzyme ImmunoAssay), je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod. Poprvé byla představena v roce 1971 (Engvall a Perlmann, 1971), v oblasti rostlinné virologie pak v roce 1976 (Clark a Adams, 1976). Jedná se o velice rychlou, citlivou a vysoce specifickou metodu umožňující detekci a kvantifikaci protilátky či antigenu i v rozsahu několika pikogramů (Pathak a Palan, 2005). Tato metoda využívá interakce mezi proteiny, konkrétně vysoce specifickou interakci mezi antigenem a protilátkou. ELISA má různé modifikace, které můžeme primárně rozdělit do dvou skupin, a to na metody přímé a metody nepřímé. Přímá ELISA je založena na vazbě značené primární protilátky přímo na hledaný protein, nepřímá ELISA je pak založena na vazbě značené sekundární protilátky na protilátku primární. DAS-ELISA patří mezi přímé imunologické detekční metody. Protilátky (primární či sekundární) jsou obvykle značeny enzymaticky (enzym je konjugován s protilátkou, nejčastěji se používá alkalická fosfatáza – AP či křenová peroxidáza – HRP) (Bos, 1999).

V prvním kroku metody DAS-ELISA je využívána schopnost proteinů (v tomto případě imunoglobulinů) vázat se na sorbční povrch mikrotitrační polystyrenové či polyvinyllové destičky (Pathak a Palan, 2005). Pokud jsou ve vzorku přítomny patogenní buňky, dojde v dalším kroku k navázání antigenu na protilátku specifickým vazebným místem – epitopem. Následně se váže stejná protilátka, která je však v této fázi metody konjugovaná s enzymem. Tento enzym pak katalyzuje chemickou přeměnu specifického bezbarvého substrátu (4-nitrofenylfosfát) na produkt (4-nitrofenol a fosfát), který je barevný, a tedy opticky detekovatelný a spektrofotometricky měřitelný. ELISA však neumožňuje přímé měření protilátky či antigenu v neznámém vzorku bez navázání na čistou protilátku nebo antigen (Murphy, 2012).

3. Cíle práce

Cílem práce bylo:

- Nalézt na území České republiky další planě rostoucí jeteloviny různých druhů infikované *Clover yellow mosaic virus* a *Red clover vein mosaic virus*.
- Identifikovat rostliny semenáčků jetele, které byly pomocí mechanické inokulace infikovány českým izolátem RCVMV a hodnotit vývoj příznaků u infikovaných rostlin.
- Vyhodnotit úspěšnost mechanické inokulace u jednotlivých odrůd.

4. Metodika práce

4.1 Materiál

Pro experimenty byly použity rostliny jetele lučního, které byly v roce 2012 mechanicky inokulované českým izolátem *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) a které pochází ze šlechtitelské stanice Ing. Hana Jakešová, CSc. – šlechtění jetelů a trav (odrůdy Amos – 14 rostlin, Blizzard – 19 rostlin, Nodula – 17 rostlin, Rezista – 20 rostlin a Sprut – 4 rostliny). Dále byly testovány planě rostoucí rostliny jetele lučního, hrachu setého, tollice vojtěšky a pestrovky kulovité pocházející z lokality Boršov nad Vltavou – 28 rostlin, rostliny jetele lučního pocházející z lokality Lašovice – 28 rostlin a rostlina jetele plazivého pocházející z lokality Plešovice.

4.2 Metody

4.2.1 Detekce *Red clover vein mosaic virus* pomocí DAS-ELISA

Pro detekci RCVMV pomocí DAS-ELISA byla použita souprava od prof. J. H. Vettena (Německo).

Potažení polystyrenové mikrotitrační destičky

Nejprve byly potaženy stěny jamek polystyrenové mikrotitrační destičky potahovacím pufrům (coating buffer) smíchaným s protilátkou (IgG) v poměru 1:1000 ve stanoveném množství 100 μ l do každé z používaných jamek. U všech pufrů, které byly při této metodě používány, bylo nutné změření a případná úprava pH před každou aplikací daného pufru. Po nanesení protilátek (IgG) byla destička umístěna na dobu čtyř hodin do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C.

Homogenizace vzorků

Rostlinný materiál byl vložen do homogenizačních sáčků (Bioreba AG), poté bylo přidáno konkrétní množství homogenizačního pufru (sample extraction buffer), a to v poměru 1:10, a vzorky byly homogenizovány pomocí speciálního mechanického homogenizátoru (Homex 6, Bioreba AG). Takto homogenizované vzorky byly vždy až do aplikace na mikrotitrační destičku uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C.

Promývání mikrotitrační destičky, nanášení vzorků

Po inkubaci byly volné reagenty vymyty z mikrotitrační destičky promývacím pufrem (Phosphate buffered saline – Tween). V závislosti na počtu vzorků jsme tento krok prováděli buď ručním pipetováním pufru do každé z jamek anebo pomocí automatické promývačky. Objem tohoto pufru může být vyšší než 100 µl. Promývání jamek bylo opakováno také po inkubaci vzorků a po navázání IgG-AP na antigeny.

Následné nanášení vzorků probíhalo vždy stejným způsobem, a to podle předem stanoveného schématu (viz kapitola Přílohy – Obr. 9; str.). Jako blank byl použit čistý homogenizační pufr (sample extraction buffer), jako negativní kontrola byly použity zdravé (neinokulované) rostliny jetele lučního, pozitivní kontrola (hrách setý) byla součástí soupravy od prof. H. J. Vettena (Německo). Blank, negativní kontrola, pozitivní kontrola i všechny vzorky byly nanášeny s jedním opakováním. Po aplikaci vzorků byla destička uložena alespoň na 16 hodin do chladničky (teplota 4 °C).

Navázání IgG-AP na antigeny

V dalším kroku byla do jamek nanášena směs konjugátu IgG-AP a konjugátového pufru (conjugate buffer), a to v poměru 1:1000. Mikrotitrační destička byla následně umístěna na 4 hodiny do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C.

Přidání specifického substrátu

Poslední nanášenou reagentou byl substrát (4-nitrofenylfosfát, Sigma) dodávaný v tabletách o hmotnosti 5 mg. Na každých 5 mg substrátu tablety připadá 5000 µl substrátového pufru (substrate buffer). Jelikož bylo v této fázi potřeba pracovat ve tmě, byla mikrotitrační destička umístěna do speciálního neprůsvitného boxu.

Vyhodnocení testu pomocí spektrofotometru

Po inkubaci destičky ve tmě při pokojové teplotě (20 minut) byla na spektrofotometru (Spectra Fluor, Tecan) měřena absorbance při 405 nm. Měření absorbance bylo vždy opakováno ještě po uplynutí dalších cca. 15 minut. Vyhodnocení testu bylo provedeno počítačem v programu KIMW. Pokud byly zjištěny pozitivní vzorky, byla pořízena fotodokumentace mikrotitračních destiček.

4.2.2 Detekce *Clover yellow mosaic virus* pomocí DAS-ELISA

Pro detekci CIYMV byla použita komerčně dostupná souprava (DSMZ, Německo).

Postup práce při zjišťování přítomnosti CIYMV byl téměř ve všech krocích shodný s postupem práce při detekci přítomnosti RCVMV. Výjimkou byl objem nanášených komponent, který činil u tohoto druhu viru 200 µl na každou z používaných jamek. To přirozeně znamenalo navýšení objemu IgG, IgG-AP a počtu používaných tablet specifického substrátu (poměry těchto látek a konkrétních pufrů zůstávaly zachovány).

Další změnou oproti detekci přítomnosti RCVMV byla doba inkubace po nanesení specifického substrátu, ta se u tohoto druhu viru pro dosažení ideální hodnoty absorbance pozitivní kontroly prodlužuje na cca. 35 minut.

Jako blank byl opět použit čistý homogenizační pufr, jako negativní kontrola rostliny jetele lučního a pozitivní kontrola (hrách setý) byla dodána jako součást komerčně dostupné soupravy (DSMZ, Německo).

4.2.3 Hodnocení příznaků

Vyhodnocení příznaků u rostlin, u kterých byla pomocí DAS-ELISA potvrzena přítomnost RCVMV, bylo prováděno vizuálně, a to nejprve v době prvního testování (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV) a následně při opětovném testování prováděném za účelem potvrzení pozitivních výsledků (cca. 21 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV). Hodnocené rostliny byly uchovávány za kontrolovaných podmínek ve skleníku, v letních měsících byly pěstovány pod ochrannou sítí mimo skleník, aby nedošlo k napadení jinými rostlinnými viry.

4.3 Složení pufrů

Všechny používané pufrы byly připravované podle pokynů DSMZ. Všechny níže zmíněné pufrы byly skladovány při teplotě 4 °C a používány maximálně po dobu 2 měsíců od jejich namíchání.

Potahovací pufr (Coating buffer)

1,59 g uhličitanu sodného (sodium carbonate) – Na_2CO_3

2,93 g hydrogenuhličitanu sodného (sodium bicarbonate) – NaHCO_3

0,20 g azidu sodného (sodium azide) – NaN_3

Všechny komponenty byly rozpuštěny v 900 ml destilované vody a pomocí HCl bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu, a to 9,6. Následně byl objem doplněn na 1 l.

PBS (Phosphate buffered saline)

8,0 g chloridu sodného (sodium chloride) – NaCl

0,2 g dihydrid fosforečnanu draselného (monobasic potassium phosphate) – KH_2PO_4

1,15 g fosforečnanu disodného (dibasic sodium phosphate) – Na_2HPO_4

0,2 g chloridu draselného (potassium chloride) – KCl

0,2 g azidu sodného (sodium azide) – NaN_3

Všechny komponenty byly rozpuštěny v 900 ml destilované vody a pomocí HCl, nebo NaOH bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu, a to 7,4. Následně byl objem doplněn na 1 l.

Promývací pufr (PBS – Tween = PBST)

PBS + 0,5 ml Tween 20 na 1 l

Homogenizační pufr (Sample extraction buffer)

PBST + 2% PVP (Serva PVP – 15 polyvinyl pyrrolidone) na 0,5 l

Všechny komponenty byly smíchány a pomocí HCl, nebo NaOH bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu, a to 7,4. Následně byl objem doplněn na 1 l.

Konjugátový pufr (Conjugate buffer)

PBST + 2% PVP (2,0 g) + 0,2% (0,2 g) sušený vaječný bílek (egg albumin, Sigma)

Substrátový pufr (Substrate buffer) – pH 9,8

97 ml dietanolaminu (diethanilamine)

600 ml H_2O

0,2 g azidu sodného (sodium azide) – NaN_3

Všechny komponenty substrátového pufru byly smíchány, pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 9,8 a následně byl objem doplněn na 1 l.

5. Výsledky

5.1 *Red clover vein mosaic virus*

1) Z celkového počtu 74 rostlin semenáčků jetele lučního (odrůda Amos – 14 rostlin, odrůda Blizzard – 19 rostlin, odrůda Nodula – 17 rostlin, odrůda Rezista – 20 rostlin a odrůda Sprut – 4 rostliny), které byly mechanicky inokulované českým izolátem RCVMV a následně po cca. 15 měsících testované pomocí metody DAS-ELISA, byly nalezeny 3 rostliny vykazující přítomnost tohoto druhu viru (odrůdy Amos, Blizzard a Rezista) (viz Přílohy – Obr. 1, Obr. 6, Obr. 7). Procentuální úspěšnost mechanické inokulace semenáčků jetele lučního českým izolátem RCVMV činla tedy podle výsledků DAS-ELISA 2,22 % (74 testovaných rostlin/ 3 infikované rostliny). Hodnoty absorbance blanku při DAS-ELISA činily u mechanicky inokulovaných rostlin: 0,000, -0,005, 0,000, -0,001, 0,000 a 0,056. Hodnoty absorbance negativních kontrol činily 0,009, 0,002, 0,005, 0,007, -0,001 a 0,003. Hodnoty absorbance pozitivních kontrol činily 1,240, 1,296, 0,126, 0,165, 0,828 a 1,049. Pozitivní vzorky měly následující hodnoty absorbancí: 1,306/ 1,122 (číslo 7, odrůda Blizzard), 1,103/ 1,090 (číslo 15, odrůda Amos) a 1,182/ 1,309 (číslo 30, odrůda Rezista). Výsledky DAS-ELISA těchto mechanicky inokulovaných rostlin jsou uvedeny v Tab. II.

2) Mechanicky inokulované rostliny jetele lučního, které byly předchozím testováním pomocí DAS-ELISA vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost RCVMV, byly pro potvrzení pozitivních výsledků po dalších cca. 6 měsících znovu testovány. Předchozí výsledky se potvrdily (viz Přílohy – Obr. 8). Hodnoty absorbance blanku činily tentokrát 0,000 a -0,017, hodnoty absorbance negativních kontrol činily -0,009 a -0,016 a hodnoty absorbance pozitivních kontrol 0,133 a 0,148. Hodnoty absorbance vzorků činily 1,028/ 1,044 (číslo 1, odrůda Amos), 2,028/ 2,005 (číslo 2, odrůda Blizzard), 1,990/ 1,868 (číslo 3, odrůda Rezista). Potvrzení pozitivních výsledků pomocí DAS-ELISA u těchto tří rostlin dokumentujeme v Tab. III.

3) U jetele lučního odrůdy Amos infikovaného virem RCVMV byla v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorována zakrslost celé rostliny a dále pak červenání listů (viz kapitola Přílohy – Obr. 2).

U jetele lučního odrůdy Blizzard infikovaného virem RCVMV byla v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorována drobnolistost (viz kapitola Přílohy – Obr. 3).

U jetele lučního odrůdy Rezista infikovaného virem RCVMV nebyly v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorovány žádné příznaky svědčící o nákaze rostliny tímto druhem viru (viz kapitola Přílohy – Obr. 4).

Cca. 21 měsíců po mechanické inokulaci byl u všech tří rostlin jetele lučního – odrůdy Amos, Blizzard a Rezista infikovaných RCVMV pozorován shodný příznak infekce RCVMV, a to drobnolistost (viz kapitola Přílohy – Obr. 5).

Tab. II: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin jetele lučního ze šlechtitelského materiálu testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Absorbance	RCVMV	ČV	Absorbance	RCVMV
B	0,0084	N	37	-0,008/ 0,001	N
NK	0,0042	N	38	-0,008/ -0,008	N
PK	0,784	P	39	-0,002/ -0,005	N
1	0,045/ -0,004	N	40	0,008/ -0,005	N
2	-0,004/ -0,007	N	41	0,004/ -0,002	N
3	0,000/ 0,003	N	42	0,006/ -0,002	N
4	0,001/ -0,014	N	43	-0,001/ -0,001	N
5	-0,013/ -0,015	N	44	-0,007/ -0,004	N
6	-0,011/ -0,004	N	45	-0,003/ -0,001	N
7	1,306/ 1,122	P	46	0,000/ -0,008	N
8	-0,011/ -0,012	N	47	-0,005/ -0,008	N
9	-0,011/ -0,002	N	48	-0,002/ 0,003	N
10	-0,004/ 0,001	N	49	0,001/ -0,004	N
11	-0,011/ -0,005	N	50	-0,003/ -0,001	N
12	-0,007/ -0,004	N	51	0,002/ 0,005	N
13	-0,007/ -0,009	N	52	0,025/ 0,011	N
14	-0,012/ -0,006	N	53	0,009/ 0,028	N
15	1,103/ 1,090	P	54	0,007/ 0,026	N
16	-0,001/ -0,011	N	55	0,001/ 0,002	N
17	-0,001/ -0,008	N	56	0,002/ 0,003	N
18	-0,002/ 0,003	N	57	0,003/ 0,000	N
19	-0,004/ -0,007	N	58	-0,004/ -0,002	N
20	-0,008/ -0,006	N	59	-0,003/ -0,003	N
21	-0,004/ 0,000	N	60	-0,002/ -0,002	N
22	-0,001/ -0,006	N	61	0,000/ -0,001	N
23	-0,009/ -0,003	N	62	-0,001/ -0,002	N
24	-0,004/ 0,000	N	63	0,000/ -0,001	N
25	0,016/ 0,009	N	64	-0,001/ -0,001	N
26	0,010/ 0,007	N	65	-0,001/ -0,002	N
27	0,021/ 0,034	N	66	0,000/ -0,002	N
28	0,006/ -0,005	N	67	-0,002/ -0,001	N
29	-0,004/ -0,008	N	68	0,002/ 0,000	N
30	1,182/ 1,309	P	69	0,008/ -0,001	N
31	-0,007/ -0,001	N	70	0,007/ -0,002	N
32	-0,008/ -0,008	N	71	0,000/ -0,002	N
33	-0,005/ 0,011	N	72	-0,003/ -0,003	N
34	0,007/ 0,003	N	73	0,001/ -0,002	N
35	-0,009/ -0,010	N	74	-0,001/ 0,000	N
36	0,001/ -0,001	N			

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola (zaznamenány průměry hodnot), Číslo vzorku

P – vzorek pozitivní na přítomnost RCVMV

N – vzorek negativní na přítomnost RCVMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

Tab. III: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin jetele lučního (odrůdy Amos, Blizard a Rezista) ze šlechtitelského materiálu, u kterých byla předchozím testováním (DAS-ELISA) zjištěna přítomnost *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Odrůda	Absorbance	RCVMV
B	-	0,000/ -0,017	N
NK	-	-0,009/ -0,016	N
PK	-	0,133/ 0,148	P
1	Amos	1,028/ 1,044	P
2	Blizard	2,028/ 2,005	P
3	Rezista	1,990/ 1,868	P

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola, Číslo vzorku

N – vzorek negativní na přítomnost RCVMV

P – vzorek pozitivní na přítomnost RCVMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

4) Mezi planě rostoucími rostlinami pocházejícími z lokality Boršov nad Vltavou nebyly nalezeny žádné, které by měly pozitivní výsledky DAS-ELISA na přítomnost RCVMV, a to i přes to, že byly přednostně vybírány rostliny, které vykazovaly symptomy virového onemocnění. Jako vzorek číslo 26 byla zařazena rostlina tollice vojtěšky a jako vzorek číslo 27 byla zařazena rostlina pestrovky kulovité. U těchto rostlin jsme měli podezření na infekci RCVMV. Tento fakt se nám ale nepotvrdil. Hodnoty absorbance blanku činily v tomto případě 0,000 a -0,004, hodnoty absorbance negativních kontrol činily 0,015 a 0,003 a hodnoty absorbance pozitivních kontrol činily 1,612 a 1,801. Výsledky DAS-ELISA planě rostoucích jetelovin z této lokality jsou sumarizovány v Tab. IV.

5) Mezi planě rostoucími rostlinami jetele lučního pocházejícími z lokality Lašovice nebyly nalezeny žádné rostliny, které by byly pomocí DAS-ELISA vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost RCVMV, a to i přes to, že byly přednostně vybírány rostliny, které vykazovaly symptomy virového onemocnění. Hodnoty absorbance blanku činily 0,000 a -0,002, hodnoty absorbance negativních kontrol činily -0,001 a -0,004 a hodnoty absorbance pozitivních kontrol činily 0,163 a 0,139. Výsledky DAS-ELISA planě rostoucích rostlin jetele lučního z této lokality jsou zaznamenány v Tab. V.

Tab. IV: Výsledky DAS-ELISA u planě rostoucích rostlin jetele lučního, tolíce vojtěšky a pestrovky kulovité pocházejících z lokality Boršov nad Vltavou testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Druh rostliny	Absorbance	RCVMV
B	-	0,000/ -0,004	N
NK	<i>Trifolium pratense</i>	0,015/ 0,003	N
PK	<i>Pisum sativum</i>	1,612/ 1,801	P
1	<i>Trifolium pratense</i>	0,012/ 0,007	N
2	<i>Trifolium pratense</i>	0,004/ 0,007	N
3	<i>Trifolium pratense</i>	0,006/ 0,001	N
4	<i>Trifolium pratense</i>	-0,004/ -0,004	N
5	<i>Trifolium pratense</i>	-0,002/ -0,003	N
6	<i>Trifolium pratense</i>	-0,002/ 0,000	N
7	<i>Trifolium pratense</i>	0,000/ -0,001	N
8	<i>Trifolium pratense</i>	0,000/ 0,002	N
9	<i>Trifolium pratense</i>	0,001/ 0,002	N
10	<i>Trifolium pratense</i>	0,000/ -0,004	N
11	<i>Trifolium pratense</i>	-0,004/ -0,001	N
12	<i>Trifolium pratense</i>	-0,001/ -0,001	N
13	<i>Trifolium pratense</i>	0,005/ 0,001	N
14	<i>Trifolium pratense</i>	0,002/ 0,014	N
15	<i>Trifolium pratense</i>	0,000/ 0,000	N
16	<i>Trifolium pratense</i>	0,005/ -0,001	N
17	<i>Trifolium pratense</i>	-0,001/ 0,003	N
18	<i>Trifolium pratense</i>	0,009/ 0,003	N
19	<i>Trifolium pratense</i>	0,007/ -0,001	N
20	<i>Trifolium pratense</i>	-0,002/ 0,003	N
21	<i>Trifolium pratense</i>	0,001/ 0,003	N
22	<i>Trifolium pratense</i>	0,001/ 0,001	N
23	<i>Trifolium pratense</i>	0,001/ 0,003	N
24	<i>Trifolium pratense</i>	0,002/ 0,004	N
25	<i>Trifolium pratense</i>	0,006/ 0,012	N
26	<i>Medicago sativa</i>	0,017/ 0,017	N
27	<i>Gomphrena globosa</i>	0,008/ 0,007	N

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola, Číslo vzorku

N – vzorek negativní na přítomnost RCVMV

P – vzorek pozitivní na přítomnost RCVMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

Tab. V: Výsledky DAS-ELISA u planě rostoucích rostlin jetele lučního pocházejících z lokality Lašovice testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Absorbance	RCVMV	ČV	Absorbance	RCVMV
B	0,000/ -0,002	N	14	-0,003/ -0,004	N
NK	-0,001/ -0,004	N	15	0,022/ 0,006	N
PK	0,163/ 0,139	P	16	0,002/ -0,005	N
1	0,021/ 0,021	N	17	-0,003/ -0,004	N
2	0,010/ 0,045	N	18	-0,013/ -0,008	N
3	0,016/ -0,004	N	19	-0,011/ -0,010	N
4	-0,001/ 0,000	N	20	-0,012/ -0,002	N
5	0,045/ 0,001	N	21	-0,004/ -0,004	N
6	-0,001/ -0,013	N	22	0,003/ -0,001	N
7	-0,021/ -0,011	N	23	0,020/ 0,023	N
8	0,023/ -0,011	N	24	0,020/ 0,023	N
9	-0,003/ -0,004	N	25	0,000/ -0,001	N
10	0,002/ -0,001	N	26	-0,001/ -0,002	N
11	-0,010/ -0,007	N	27	0,000/ -	N
12	-0,002/ -0,007	N	28	-0,006/ -	N
13	-0,003/ -0,008	N			

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola, Číslo vzorku

N – vzorek negativní na přítomnost RCVMV

P – vzorek pozitivní na přítomnost RCVMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

Vzorky číslo 27 a 28 byly naneseny bez opakování

5.2 Clover yellow mosaic virus

1) Mezi planě rostoucími rostlinami, které pocházely z lokality Boršov nad Vltavou, nebyly nalezeny žádné, které by byly pomocí DAS-ELISA vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost CIYMV. Přednostně byly vybírány rostliny, které vykazovaly symptomy virového onemocnění. Jako vzorek číslo 27 byla zařazena rostlina pestrovky kulovité, jako vzorek číslo 28 rostlina hrachu setého a jako vzorek číslo 29 rostlina jetele plazivého, která pocházela z lokality Plešovice. Všechny tři rostliny vykazovaly příznaky virového onemocnění (předchozím testováním byla u pestrovky vyloučena nákaza RCVMV). Stejně tak jako v případě testování přítomnost RCVMV se přítomnost CIYMV u této rostliny nepotvrdila. Rostlina hrachu setého a jetele plazivého taktéž nevykázaly pozitivní výsledek DAS-ELISA. Hodnoty absorbance blanku činily 0,000 a -0,026, hodnoty absorbance negativních kontrol činily -0,008 a -0,004 a hodnoty absorbance pozitivních kontrol činily 0,153 a 0,132. Výsledky DAS-ELISA rostlin pocházejících z této lokality (včetně výsledků rostlin pestrovky kulovité, hrachu setého a jetele plazivého) jsou sumarizovány v Tab. VI.

Tab. VI: Výsledky DAS-ELISA u planě rostoucích rostlin jetele lučního, pestrovky kulovité a hrachu setého pocházejících z lokality Boršov nad Vltavou a výsledky DAS-ELISA rostliny jetele plazivého z lokality Plešovice testovaných na přítomnost *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Druh rostliny	Lokalita	Absorbance	CIYMV
B	-	-	0,000/ -0,026	N
NK	<i>Trifolium pratense</i>	-	-0,008/ -0,004	N
PK	<i>Pisum sativum</i>	-	0,153/ 0,132	P
1	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,014/ -0,025	N
2	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,018/ -0,023	N
3	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,024/ -0,026	N
4	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,025/ -0,028	N
5	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,028/ -0,031	N
6	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,031/ -0,026	N
7	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,019/ -0,023	N
8	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,024/ -0,027	N
9	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,026/ -0,025	N
10	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,020/ -0,027	N
11	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,030/ -0,031	N
12	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,030/ -0,023	N
13	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,022/ -0,024	N
14	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,028/ -0,026	N
15	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,023/ -0,017	N
16	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,021/ -0,023	N
17	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,023/ -0,025	N
18	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,018/ -0,023	N
19	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,014/ -0,023	N
20	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,023/ -0,028	N
21	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,022/ -0,020	N
22	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,015/ -0,024	N
23	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,019/ -0,012	N
24	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	-0,024/ -0,013	N
25	<i>Trifolium pratense</i>	Boršov n. Vltavou	0,033/ 0,019	N
26	<i>Medicago sativa</i>	Boršov n. Vltavou	-0,006/ -0,007	N
27	<i>Gomphrena globosa</i>	Boršov n. Vltavou	-0,013/ 0,004	N
28	<i>Pisum sativum</i>	Boršov n. Vltavou	-0,002/ -0,019	N
29	<i>Trifolium repens</i>	Plešovice	-0,003/ 0,065	N

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola, Číslo vzorku

N – vzorek negativní na přítomnost CIYMV

P – vzorek pozitivní na přítomnost CIYMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

2) Mezi planě rostoucími rostlinami jetele lučního pocházejících z lokality Lašovice nebyly nalezeny žádné rostliny, které by byly pomocí DAS-ELISA vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost CIYMV, a to i přes to, že byly přednostně vybírány rostliny, které

vykazovaly symptomy virového onemocnění. Hodnoty absorbance blanku činily -0,001 a -0,002, hodnoty absorbance negativních kontrol činily 0,000 a -0,003 a hodnoty absorbance pozitivních kontrol činily 0,158 a 0,131. Výsledky DAS-ELISA planě rostoucích rostlin jetele lučního z této lokality jsou zaznamenány v Tab. VII.

Tab. VII: Výsledky DAS-ELISA u planě rostoucích rostlin jetele lučního pocházejících z lokality Lašovice testovaných na přítomnost *Clover yellow mosaic virus* (CIYMV).

B/ NK/ PK/ ČV	Absorbance	CIYMV	ČV	Absorbance	CIYMV
B	-0,001/ -0,002	N	14	-0,006/ -0,012	N
NK	0,000/ -0,003	N	15	0,011/ -0,004	N
PK	0,158/0,131	P	16	0,020/ -0,004	N
1	0,000/ -0,001	N	17	-0,003/ -0,001	N
2	0,011/ -0,002	N	18	-0,015/ 0,008	N
3	-0,003/ 0,002	N	19	-0,012/ -0,010	N
4	-0,001/ -0,001	N	20	-0,010/ 0,000	N
5	0,045/ 0,023	N	21	-0,006/ -0,006	N
6	-0,012/ 0,000	N	22	0,001/ -0,003	N
7	-0,003/ -0,002	N	23	0,021/ -0,021	N
8	0,021/0,003	N	24	0,020/ 0,022	N
9	-0,013/ 0,011	N	25	0,010/ 0,011	N
10	-0,002/ -0,012	N	26	-0,001/ -0,002	N
11	-0,011/ -0,032	N	27	-0,008/ -	N
12	-0,002/ -0,001	N	28	-0,007/ -	N
13	-0,007/ -0,006	N			

B/ NK/ PK/ ČV = Blank, Negativní kontrola, Pozitivní kontrola, Číslo vzorku

N – vzorek negativní na přítomnost CIYMV

P – vzorek pozitivní na přítomnost CIYMV

Absorbance (1. měření/ opakování)

Vzorky číslo 27 a 28 byly naneseny bez opakování

6. Diskuze

Hlavním problémem poznatků o výše popsaných druzích virů je především nedostatečné množství informací v některých oblastech výzkumu. Například možnosti přenosu jak CIYMV, tak RCVMV jsou velice málo prozkoumány. Téměř všechny výše citované práce zabývající se touto problematikou jsou i několik desetiletí staré, mnohé z nich pocházejí ještě z doby před vynálezem PCR metody (Graves a Hagedorn, Hampton, 1963; 1956; Johnson, 1942; Matsulevich, 1957; Pratt, 1961). Vzhledem k tomu, že není dostupná literatura o mechanickém přenosu RCVMV na rostliny jetele lučního, můžeme pouze uvažovat o tom, proč byla mechanická inokulace v našem případě úspěšná pouze v 2,2 % a jakým způsobem by bylo možné metodu optimalizovat. Tento proces je komplexní záležitostí a tak i nesprávně zvolený pufr může mít zásadní vliv na výsledek celého procesu.

Jedna z rostlin jetele lučního (odrůda Amos), u které byl pomocí DAS-ELISA prokázán úspěšný přenos RCVMV mechanickou inokulací, vykazovala (cca. 15 měsíců po mechnické inokulaci) příznak virového onemocnění, který není v literatuře uváděn jako typický pro nákazu tímto druhem rostlinného viru, a to červenání listů. Tento znak už však při pozdějším hodnocení příznaků (cca. 21 měsíců po mechanické inokulaci) nebyl na dané rostlině pozorován. Jedna ze zmíněných pozitivních rostlin jetele lučního (odrůda Rezista) nevykazovala zpočátku (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) žádné známky virového onemocnění. Po stejné době od mechanické inokulace vykazovala 3. pozitivní rostlina jetele lučního (odrůda Blizzard) drobnolistost. Po dalších cca. 6 měsících byl u všech 3 rostlin jetele lučního (odrůdy Amos, Blizzard a Rezista) pozitivních na přítomnost RCVMV pozorován shodný znak nákazy tímto druhem viru, a to drobnolistost. Skutečnost, že na zmíněné rostlině (odrůda Rezista) nebyly nejprve pozorovány žádné příznaky virového onemocnění, můžeme přisuzovat uplynutí nedostatečně dlouhé doby od mechanické inokulace. Mozaika listů – znak, který je uváděn jako typický pro rostliny infikované RCVMV, se v době hodnocení příznaků neobjevil u žádné ze tří rostlin, které byly pozitivní na přítomnost tohoto viru (www.dpvweb.net).

Důvodem pro testování planě rostoucích jetelovin na přítomnost CIYMV byl fakt, že pomocí moderních metod detekce nebyl tento druh rostlinného viru na území Evropy dlouho prokázán s výjimkou jediného případu z Velké Británie, kdy byl tento virus nalezen na rodu sporýš – *Verbena* (Mumford a kol., 2005). V minulých letech se však podařilo najít jednu infikovanou rostlinu – jetel luční i na území České republiky a tento virus se také podařilo přenést pomocí mechanické inokulace na další rostliny (Fránová a kol., 2011; 2012). RCVMV byl pro tuto práci vybrán z důvodu zjištění profesora H. J. Vettena z Julius

Kühn-Institut (JKI, Německo) z minulých let – americké izoláty tohoto viru se s evropskými shodují pouze v obalovém proteinu, zatímco zbytek genomu je odlišný. Díky spolupráci Dr. Ing. Jany Fránové s prof. Vettenem nám byly pro nalezení dalších infikovaných rostlin poskytnuty protilátky proti tomuto druhu viru. V minulých letech se podařilo takové rostliny najít a přenést virus pomocí mechanické inokulace na hrách setý. Následně bylo mechanicky inokulováno celkem 74 semenáčků jetele lučního (J. Fránová – ústní sdělení). Dosažené výsledky DAS-ELISA planě rostoucích rostlin při zjišťování přítomnosti CIYMV a RCVMV však nesplnily naše očekávání. Vzhledem k tomu, že jsme mezi planě rostoucími rostlinami vybírali přednostně takové, které vykazovaly příznaky virového onemocnění (zejména mozaiku listů), předpokládali jsme, že najdeme mezi těmito rostlinami některé, které budou jedním z daných druhů virů infikované. Jelikož se přítomnost ani CIYMV, ani RCVMV nepotvrdila, domníváme se, že testované rostliny byly vzhledem k vykazovaným symptomům infikované jiným druhem viru (mozaika listů je typickým příznakem při nákaze rostliny např. *Alfalfa mosaic virus*) (www.dpvweb.net). Potvrzení dané domněnky už ale nebylo předmětem této bakalářské práce. Při testování planě rostoucích rostlin z lokality Lašovice a při provádění DAS-ELISA pro potvrzení pozitivních výsledků rostlin infikovaných RCVMV mechanickou inokulací byly naměřeny relativně nízké hodnoty absorbance pozitivních kontrol. Přestože se dané hodnoty po uplynutí delší doby od přidání specifického substrátu zvýšily, neměly stále ideální hodnotu, a to 1,000. Toto bylo způsobeno opakovaným používáním pozitivní kontroly (dané vzorky patřily mezi poslední testované). Při testování planě rostoucích rostlin na přítomnost CIYMV byly taktéž naměřeny nízké hodnoty absorbance pozitivních kontrol. Pozitivní kontrola byla dodána jako součást komerčně dostupné soupravy (DSMZ, Německo), homogenát byl však později kvůli potřebě většího objemu naředěn. Ve všech případech ale měly pozitivní kontroly takové hodnoty absorbance, které počítačový program KIMW hodnotí jako jasně pozitivní.

Jeden z hlavních zdrojů informací – internetová databáze www.dpvweb.net obsahuje informace, které, soudě podle obsahu, nejsou dlouhou dobu aktualizované. Toto se týká především geografické distribuce a epidemiologie. V současné době jsou informace týkající se výskytu jednotlivých druhů rostlinných virů velice specifické. Publikované články jsou zaměřené spíše na ojedinělé či dokonce první případy výskytu daného viru na konkrétních rostlinných druzích nebo v dané lokalitě (Lochart a kol., 2013; Larsen a kol., 1996). Dnes se také pozornost upírá na organizaci genomů jednotlivých druhů virů – na kompletní nukleotidové sekvence a s tím související následné fylogenetické analýzy (Larsen a kol., 2009).

7. Závěr

1) Mezi planě rostoucími rostlinami testovanými pomocí metody DAS-ELISA na přítomnost *Rec clover vein mosaic virus* a *Clover yellow mosaic virus* nebyly nalezeny žádné vzorky vykazující přítomnost těchto druhů viru.

2) Z celkového počtu 74 rostlin semenáčků jetele lučního (odrůda Amos – 14 rostlin, odrůda Blizzard – 19 rostlin, odrůda Nodula – 17 rostlin, odrůda Rezista – 20 rostlin a odrůda Sprut – 4 rostliny), které byly mechanicky inokulované českým izolátem RCVMV a následně testované pomocí metody DAS-ELISA, byly nalezeny 3 rostliny vykazující přítomnost tohoto druhu viru (odrůdy Amos, Blizzard a Rezista).

3) U jetele lučního odrůdy Amos infikovaného virem RCVMV byla v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorována zakrslost celé rostliny a dále pak červenání listů.

U jetele lučního odrůdy Blizzard infikovaného virem RCVMV byl v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorován jeden z možných příznaků nákazy tímto druhem viru – drobnolistost.

U jetele lučního odrůdy Rezista infikovaného virem RCVMV nebyly v době provedení DAS-ELISA (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci) pozorovány žádné příznaky svědčící o nákaze rostliny tímto druhem viru.

U žádné z rostlin jetele lučního pozitivních na přítomnost RCVMV nebyla pozorována mozaika listů.

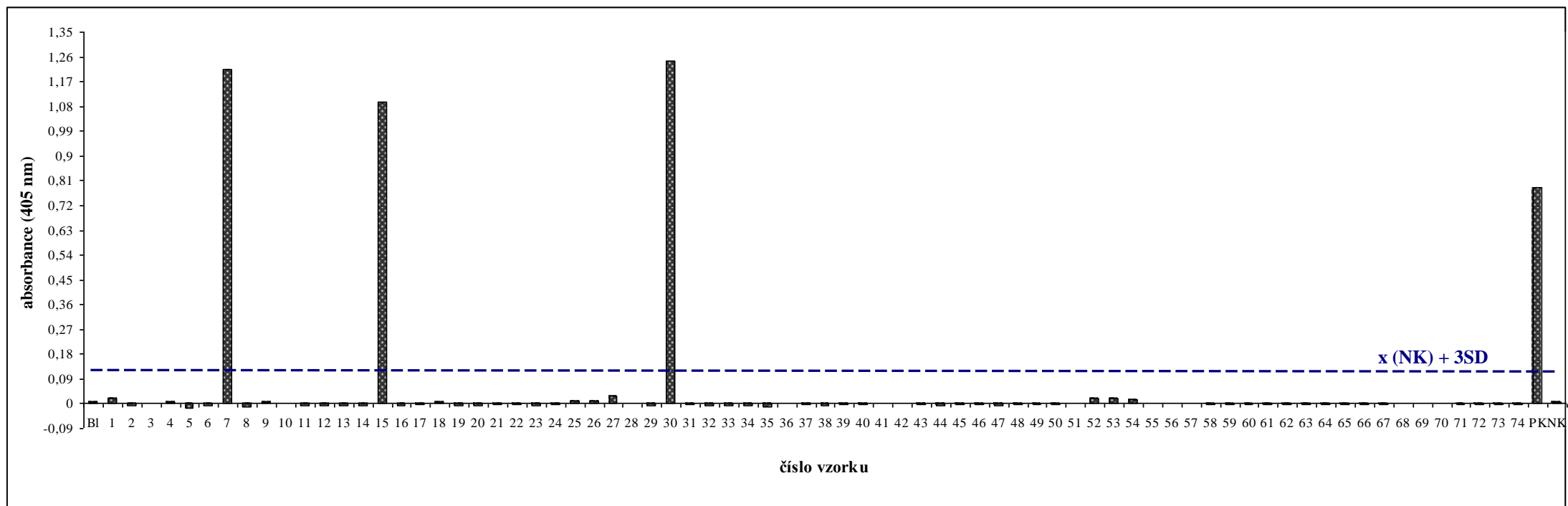
Cca. 21 měsíců po mechanické inokulaci byl u všech tří rostlin jetele lučního – odrůdy Amos, Blizzard a Rezista infikovaných RCVMV pozorován shodný příznak infekce RCVMV, a to drobnolistost.

4) Procentuální úspěšnost mechanické inokulace semenáčků jetele lučního českým izolátem RCVMV činila podle výsledků DAS-ELISA 2,22 % (74 testovaných rostlin/ 3 infikované rostliny).

8. Přílohy

8.1 Graf

Obr. 1: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin jetele lučního ze šlechtitelského materiálu testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus*.



BI = Blank

NK = Negativní kontrola

PK = Pozitivní kontrola

1 – 74 = Číslo vzorku

(uvedeny průměry hodnot 1. měření a opakování ze všech tří mikrotitračních destiček)

8.2 Obrázky



Obr. 2: Zakrslost a červení mladých listů jetele lučního odrůdy Amos infikovaného virem *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV).



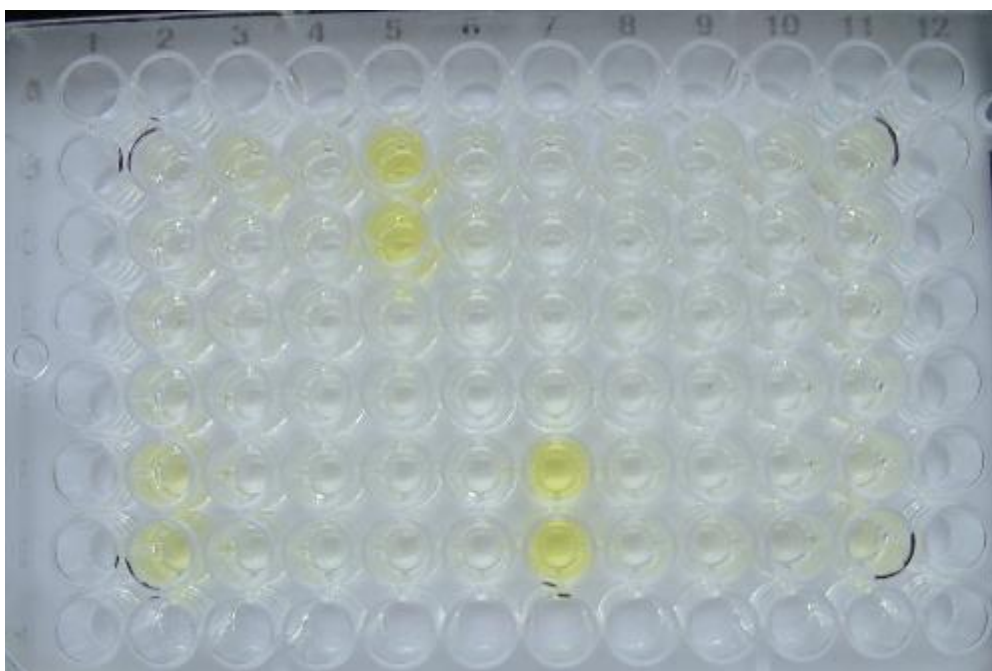
Obr. 3: Drobné listy jetele lučního odrůdy Blizzard infikovaného virem *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV).



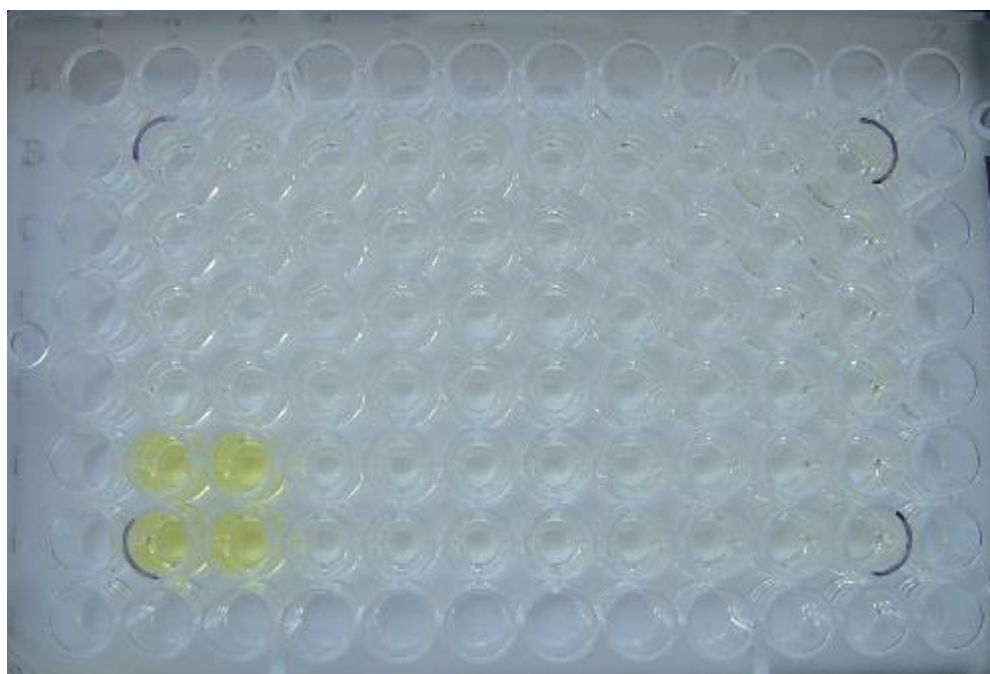
Obr. 4: Jetel luční odrůdy Rezista infikovaný virem *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) bez viditelných příznaků virového onemocnění (cca. 15 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV).



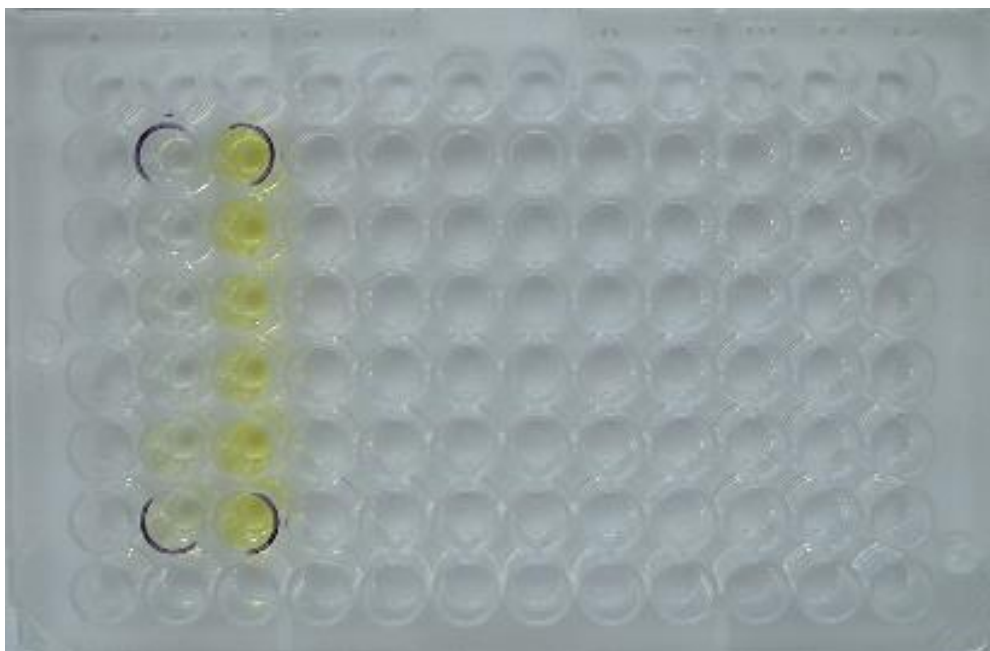
Obr. 5: Jetel luční odrůdy Blizzard infikovaný virem *Red clover vein mosaic virus* (RCVMV) vykazuje jeden z možných symptomů nákazy – drobnolistost (cca. 21 měsíců po mechanické inokulaci českým izolátem RCVMV).



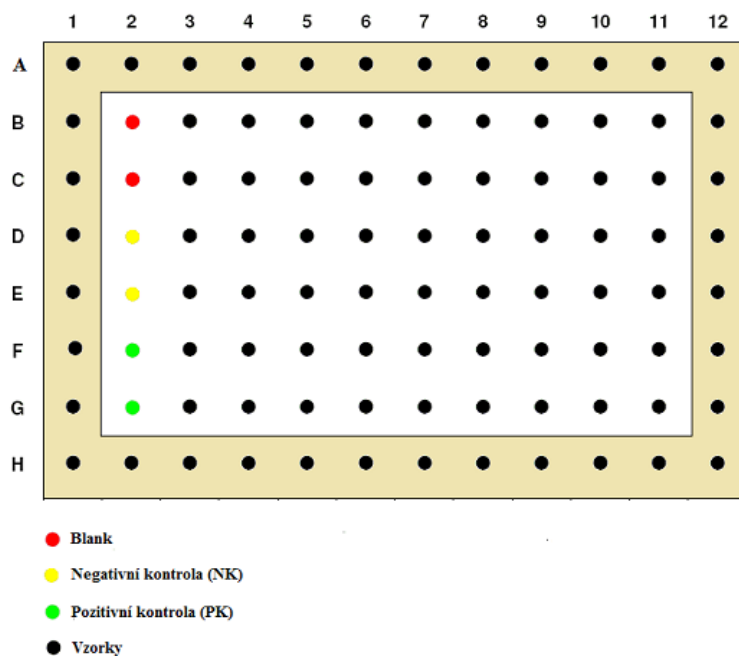
Obr. 6: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin jetele lučního ze šlechtitelského materiálu testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus* – blank v pozicích B2 a C2, negativní kontrola v pozicích D2 a E2, pozitivní kontrola v pozicích F2 a G2, pozitivní vzorek (číslo 7) v pozicích B5 a C5 a pozitivní vzorek (číslo 15) v pozicích F7 a G7.



Obr. 7: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin jetele lučního ze šlechtitelského materiálu testovaných na přítomnost *Red clover vein mosaic virus* – blank v pozicích B2 a C2, negativní kontrola v pozicích D2 a E2, pozitivní kontrola v pozicích F2 a G2, pozitivní vzorek (číslo 30) v pozicích F3 a G3.



Obr. 8: Výsledky DAS-ELISA u mechanicky inokulovaných rostlin ze šlechtitelského materiálu, u kterých byla předchozím testováním (DAS-ELISA) zjištěna přítomnost *Red clover vein mosaic virus* – blank v pozicích B2 a C2, negativní kontrola v pozicích D2 a E2, pozitivní kontrola v pozicích F2 a G2, pozitivní vzorek (odrůda Blizard) v pozicích B3 a C3, pozitivní vzorek (odrůda Amos) v pozicích D2 a E2 a pozitivní vzorek (odrůda Rezista) v pozicích F2 a G2.



Obr. 9: Schéma pořadí komponent nanášených na polystyrenovou mikrotitrační destičku při DAS-ELISA testu.

9. Zdroje

AbouHaidar, M. G. (1983). The structure of the 5' and 3' ends of *Clover yellow mosaic virus* RNA. *Canadian Journal of Microbiology* **29**, 151 – 156.

Bercks, R., Brandes, J. (1963). Elektronenmikroskopische und serologische Untersuchungen zur Klassifizierung des '*Clover yellow mosaic virus*'. *Phytopathology* **47**, 381 – 390.

Borecký, L. (1983). Vírusy, imunita a interferón. Osveta, Martin, Slovakia.

Bos, L. (1999). Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a text book of plant virology. Backhuys, Leiden, The Netherlands.

Brandes, J. (1964). Identifizierung von gestreckten pflanzenpathogenen Viren auf morphologischer Grundlage. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-Forstwirtschaft*. **110**, pp.130.

Brandes, J., Quantz, L. (1955). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Buschbohnenviren (Phaseolus-Virus 1 und Phaseolus-Virus 2). *Naturwissenschaften* **42**, pp. 588.

Clark, M. F., Adams, A. N. (1976). Characteristic of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475 – 483.

Edwardson, J. R., Christie, R. G. (1991). Handbook of viruses infecting legumes. CRC Press, Florida, The United States of America.

Engvall, E., Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871 – 874.

Esau, K., Hoefert, L. L. (1972). Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with *Beet western yellows virus*. *Journal of Ultrastructure Research* **40**, 556 – 557.

Foster, R. L. S., Musgrave, D. R. (1985). *Clover yellow vein virus* in white clover (*Trifolium repens*) and sweet pea (*Lathyrus odoratus*) in the North Island of New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **28**, 575 – 578.

Francki, R. I. B., Hatta, T. (1980). *Cucumber mosaic virus* – variation and problems of identification. *Acta Horticultrae* **110**, 167 – 174.

Fránová J., Jakešová, H., Kubelková, D., Kolářová, K. (2012). Pokrok ve výzkumu virů a fytoplasem infikujících píceňiny v České republice. Zborník abstraktov z XIX. Slovenskej a českej konferencie o ochrane rastlín. Nitra. Slovenská republika, 137.

Fránová J., Jakešová, H., Kubelková, D., Orsagová M., Petrzik K., Lauterer, P. (2011). Research on viruses and phytoplasmas infecting clover plants in the Czech Republic. Book of abstracts. 4th conference of International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV). Antequera, Málaga. Spain, 51.

- Gibbs, A. J., Varma, A., Woods, R. D. (1966). Viruses occurring in white clover (*Trifolium repens* L.) from permanent pastures in Britain. *Annals of Applied Biology* **58**, 231 – 240.
- Gibbs, A. J., Nixon, H. L., Woods, R. D. (1963). Properties of purified preparations of Lucerne mosaic virus. *Virology* **19**, 441 – 449.
- Graves, C. H., Hagedorn, D. (1956). The *Red clover vein mosaic virus* in Wisconsin. *Phytopathology* **46**, 257 – 260.
- Hagedorn, D. J. (1949). Wisconsin pea stunt, a newly described disease. *Journal of Agricultural Research* **78**, 617 – 626.
- Hagedorn, D. J. (1958). Some observations on diseases of *Pisum sativum* in several European countries in 1957. *T. Pl.Ziekten* **64**, 263 – 268.
- Hampton, R. O. (1963). Seed transmission of *White clover mosaic* and *Clover yellow mosaic viruses* in red clover. *Phytopathology* **53**, 1139.
- Hanson, E. W., Hagedorn, D. J. (1961). Viruses of red clover in Wisconsin. *Agronomy Journal* **53**, 63 – 67.
- Hollings, M., Nariani, T. K. (1965). Some properties of *clover yellow vein*: A virus of *Trifolium repens* L. *Annals of Applied Biology* **56**, 99 – 109.
- Hull, R. (2009). Comparative plant virology. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Jamalainien, E. A. (1957). On plant virus diseases and viruslike diseases in Finland (Finnish, with English summary). *Publ. Finn. State Agric. Res. Board* **158**, pp. 58.
- Johnson, F. (1942). The complex nature of white clover mosaic. *Phytopathology* **32**, 103 – 116.
- Khan, J. A., Dijkstra, J. (2006). Handbook of plant virology. The Haworth Press, Inc., New York, United States of America.
- Khan, M. A., Maxwell, D. P., Smith, R. R. (1978). Inheritance of resistance to *Red clover vein mosaic virus* in red clover. *Phytopathology* **68**, 1084 – 1086.
- Klaban, V. (1999). Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník. Gaudeamus, Hradec Králové, Czech Republic.
- Kochman, J., Stachyra, T. (1958). Beiträge zur Kenntnis der pflanzlichen Viruskrankheiten und virusverdächtigen Erscheinungen in Polen. *Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.,D.* (Berlin) **12**, 41 – 50.
- Koenig, R. (1971). Nucleic acid in the *Potato virus X* and in some other plant viruses: comparison of the molecular weights by electrophoresis in acrylamide-agarose composite gels. *Journal of General Virology* **10**, 111 – 114.
- Kraft, M. J., Larsen, R. C., Inglis, D. A. (1998). Diseases of pea. The pathology of food and pastures legumes. CABI and ICRISAT, New York, United States of America.

- Larsen R. C., Kaiser W. J., Wyatt, S. D. (1997). First report of a virus disease of chickpea caused by a strain of *Red clover mosaic carlavirus*. *Plant Diseases* **80**, 709.
- Larsen R. C., Myers J. R. (1998). First report of *Red clover vein mosaic carlavirus* naturally infecting lentil. *Plant Diseases* **82**, 1064.
- Larsen, R. C., Wyatt, S. D., Druffel, K. L. (2009). The complete nucleotide sequence and genome organization of *Red clover vein mosaic virus* (genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* **154**, 891 – 894.
- Lochart, B., Molloy, D., Daughtrey, M. (2013). First Report of *Alfalfa mosaic virus* occurrence in *Hydrangea* in the United States. *The American Phytopathological Society* **97**, 1258.
- Matsulevich, B. P. (1957). The effects of clover mosaic on the productivity of red clover (Translated title). *Agrobiologiya* **2**, 75 – 79.
- Maxam, A. M., Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods of Enzymology* **65**, 499 – 560.
- Mumford, R. A., Jarvis, B., Harju, V., Elmor, J., Skelton, A. (2005). The first identification of two viruses infecting trailing *Verbena* in the UK. *Plant Pathology* **54**, 568.
- Murphy, K. (2012). Janeway's Immunology. 8th ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, United States of America.
- Norton, M. R., Johnstone, J. R. (1998). Occurrence of *Alfalfa mosaic*, *Clover yellow vein*, *Subterranean clover red leaf*, and *White clover mosaic viruses* in white clover throughout Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* **49**, 723 – 728.
- Osborn, H. T. (1937). Vein mosaic virus of red clover. *Phytopathology* **27**, 1051 –1058.
- Pathak, S., Palan, U. (2005). Immunology essential and fundamental. 2nd ed. Science Pub Inc, Mishawaka, United States of America.
- Pratt, M. J. (1961). Studies on *Clover yellow mosaic* and *White clover mosaic viruses*. *Canadian Journal of Botany* **39**, 655 – 665.
- Pratt, M. J., Reichmann, M. E. (1961). Characterization of *Clover yellow mosaic virus* and its distinction from *White clover mosaic virus*. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society* **28**, 13.
- Quantz, L. (1958). Ein Beitrag zur Kenntnis der Erbsenvirosen in Deutschland. *Nach. Bl. dtsh. Pfl.-Sch.-D.* (Braunschweig) **10**, 65 – 70.
- Sander, E. (1959). Biological properties of *Red clover vein mosaic virus*. *Phytopathology* **49**, 749 – 754.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science, U.S.A.* **74**, 5463 – 5467.

Sit, T. L., White, A., Holy, S., Padmanabhan, U., Eweida, M., Heibert, M., Mackie, G. A., AbouHaidar, M. G. (1990). Complete nucleotide sequence of *Clover yellow mosaic virus* RNA. *Journal of General Virology* **71**, 1913 – 1920.

Tomlinson, J. A., Carter, A. L., Dale, W. T., Simpson, C. J. (2008). Weed plants as sources of *Cucumber mosaic virus*. *Annals of Applied Biology* **66**, 11 – 13.

Varma, A., Gibbs, A. J., Woods, R. D. (1970). A comparative study of *Red clover vein mosaic virus* and some other viruses. *Journal of General Virology* **8**, 21 – 32.

Weber, K. A., Hampton, R. O. (1980). Transmission of two purified carlaviruses by the pea aphid. *Phytopathology* **70**, 631 – 633.

Weiss, F. (1939). A key to the typical viruses of leguminous crops. *Plant Disease Report* **23**, 352 – 361.

Xiang, H. Y., Shang, Q. X., Han, C. G., Li, D. V., Yu, J. L. (2008). First identification of *Beet western yellows virus* on sugarbeet and lettuce in China. *Plant Pathology* **57**, 390.

Zaumeyer, W. J., Goth, R. W., Ford, R. E. (1964). A new strea-producing virus of pea related to *Red clover vein mosaic virus*. *Plant Disease Report* **48**, 494 – 498.

Internetové zdroje:

<http://www.umbr.cas.cz/index.php?pg=research&dept=1&ln=cs>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=111>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=22>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=229>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=40>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=89>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=131>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=213>

<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=74>