

VYUŽITÍ CHEMOTERAPIE PROTI VIROVÝM CHOROBÁM OVOCNÝCH DRUHŮ

USE OF CHEMOTHERAPY AGAINST VIRAL DISEASES OF FRUIT SPECIES

Jiří Sedlák

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 50801

e-mail: jiri.sedlak@vsuo.cz

ABSTRAKT

Virové choroby poškozují u rostlin v různé intenzitě jejich části, ovlivňují jejich vývoj a mohou způsobit hospodářské škody snížením výnosů a kvality rostlinných produktů. Ozdravovací postupy proti rostlinným virům jsou obecně vyvíjeny zejména ve dvou základních přístupech – *in vitro* chemoterapie nebo termoterapie. Při chemoterapii ve srovnání s termoterapií odpadá potřeba technicky a finančně náročného zařízení pro dosažení a dlouhodobé udržování vysoké teploty. Chemoterapie probíhá s využitím preparátů s virostatickými účinky zabraňujícími množení viru. Chemickou látku – antivirotikum lze přidat do používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí antibakteriálních mikrofiltrů po autoklávování. Vlastní chemoterapie u rostlin pak probíhá při obvyklé pěstební teplotě 21 až 24 °C v běžné kultivační místnosti v množství desítek opakování na několika metrech čtverečních laboratoře, což zefektivňuje celý proces. Tato práce popisuje možnosti využití vybraných chemoterapeutických látek proti virovým onemocněním ovocných plodin.

Klíčová slova: virus, ovocné druhy, *in vitro*, chemoterapie

ABSTRACT

Virus diseases damage plants in varying degrees, affect their development and can cause economic damage by reducing yields and the quality of plant products. Sanitation procedures against plant viruses are generally developed in two basic approaches - *in vitro* chemotherapy or thermotherapy. In comparison with thermotherapy, chemotherapy eliminates the need for technically and financially demanding equipment to achieve and maintain high temperatures for a long time. Chemotherapy is performed using chemicals with virostatic effects that inhibit multiplication of virus. The chemical – antiviral compound is added to *in vitro* culture media using antibacterial micro-filters after autoclaving. Chemotherapy of plants is carried out in laboratory cultivation room in standard growing temperature from 21 to 24 °C in the number of dozens of repetitions on several square meters, which streamlines the whole process. This work describes the possibilities of using selected chemotherapy agents against virus diseases of fruit crops.

Keywords: virus, fruit species, *in vitro*, chemotherapy

Charakteristika a stavba rostlinných virů

Virus je submikroskopický infekční činitel, který se replikuje pouze uvnitř živých buněk hostitelského organismu. Postrádá vlastní metabolismus a jako vnitrobuněčný cizopasník je na svém hostiteli ve vysoké míře závislý. Viry infikují všechny formy života, od zvířat a rostlin po mikroorganismy, včetně bakterií a archeí. Viry se také někdy označují za struktury na rozhraní mezi živou a neživou přírodou. Nesou v sobě vlastní a jedinečnou genetickou informaci a mají schopnost vývoje a reakce na podmínky prostředí. Existuje u nich však vysoká míra závislosti na hostitelské buňce a nemohou vykonávat samostatně základní metabolické, biologické a energetické funkce, které jsou vlastní složitějším, v rámci biologické evoluce vyšším živým organismům. Otázka a konečné rozhodnutí, zda „viry jsou „živé“, je velmi obtížně zodpověditelná a spíše filozofická (Koonin a Starokadomsky 2016).

Základní konzistentní strukturní infekční částici tvoří virion. Ten se skládá z genetického materiálu, tj. molekul DNA nebo RNA, které kódují strukturu proteinů tvořících proteinový obal – kapsidu. Virová kapsida obklopuje a chrání vlastní genetický materiál. Komplex nukleové kyseliny a bílkovinného obalu je také nazýván nukleokapsid. Rostlinné viry se vyskytují v různých tvarech a velikostech od kulovitých (izometrické nebo polyhedrální) až po vláknité (filamentózní), které jsou obvykle při šířce 10 až 13 nm až po 2000 nm dlouhé (Németh 1986, Agrios 2005, Hull 2014). Ve skupině rostlinných virů početně převažují RNA viry (Desvignes 1999). Každá skupina zemědělských plodin včetně ovocných má řadu několika ekonomicky významných virů, které jsou zohledněny v certifikačním schématu pro příslušnou plodinu při produkci zdravé sadby. U ovocných dřevin převládají z hlediska hospodářské škodlivosti ve velké většině ssRNA+ viry, tedy jednovláknové (single stranded) RNA viry s pozitivní polaritou (Nagy a Pogany 2011). Podle způsobu replikace se jedná o třídu IV, dle Baltimorovy klasifikace, kdy mRNA je identická s genomem, a může být proto přímo použita pro syntézu proteinů viru (Baltimore 1971, Baltimore 1974). Baltimorovo třídění popisuje zejména mechanismus replikace virového patogena, nezohledňuje ale tvar virové proteinové kapsidy ani taxonomické třídění nebo evoluční vývoj.

Průnik virů do rostlin

Virová onemocnění poškozují u rostlin v různé intenzitě jejich části, ovlivňují jejich vývoj a mohou způsobit hospodářské škody snížením výnosů a kvality rostlinných produktů. Na rozdíl od buněk živočišných, nemají rostlinné buňky specifické receptory, které by umožnily aktivní průnik virových patogenů. Rostlinné viry proto pronikají dovnitř buněk pasivně obvykle přes poranění spojená s poškozením buněčné stěny mechanicky nebo prostřednictvím vektorového organismu. Nepotřebují proto žádné proteiny rozeznávající specificky buněčnou stěnu (Hull 2014). Po proniknutí do buňky je cílem viru částečné nebo úplné převzetí řízení buněčných mechanismů za účelem syntetizovat své vlastní identické virové částice. V průběhu infekce proniká do cytoplazmy specifická nukleová kyselina viru. Ta se spojuje s ribozomy a pomocí RNA polymerázy a dalších proteinů, nezbytných pro replikaci viru, způsobuje další přenos genetické informace patogena v rostlině. Replikace nových virových částic probíhá nejčastěji na membránách endoplazmatického retikula. U +ssRNA virů může být virová RNA infekční sama o sobě (Rosypal *et al.* 2000).

Možnosti ozdravování

Pro produkci bezvirózního množitelského materiálu lze využít v nejjednodušším případě prostého oddělení a následné regenerace meristematické oblasti rostliny, a to nejčastěji v podmínkách *in vitro* kultur. Metoda je založena na principu, že virové částice se

z vaskulárního systému rostliny do intenzivně se dělicího vrcholového meristému dostávají přes mezibuněčné prostory velmi pomalu. Meristémových buněk je však málo, jsou těžko oddělitelné od viry infikovaných buněk a i při dosažené regeneraci hrozí riziko somaklonální genetické nestability, pokud se na regeneraci podílel i nediferencovaný kalus. Přitom platí obecné pravidlo, že se zmenšující se velikostí výchozího explantátu stoupá pravděpodobnost získání viruprostého jedince. Na druhou stranu však se zmenšující se velikostí klesá pravděpodobnost přežití a úspěšné regenerace izolovaného vegetačního vrcholu (Novák, 1990).

Ozdravovací postupy proti rostlinným virům jsou obecně vyvíjeny zejména ve dvou základních přístupech – *in vitro* chemoterapie nebo termoterapie. V případě termoterapie se pak dále jedná buď o ozdravování *in vitro* kultur na agarových médiích nebo o *in vivo* ozdravování kontejnerovaných zakořeněných rostlin v pěstebním substrátu. Ozdravování se provádí ve vyšší než obvyklé pěstební teplotě, a to v rozmezí 34–39 °C. V této teplotě dochází k inhibici syntézy virových nukleových kyselin, což má za následek zastavení množení mnoha běžně se vyskytujících rostlinných virů (Knapp *et al.* 1997, Gella a Erea 1998, Mink *et al.* 1998, Janečková *et al.* 1999, Cieslinska 2002, Cieslinska 2003, Manganaris *et al.* 2003, Wang *et al.* 2006, Dziedzic *et al.* 2008, Paprštejn *et al.* 2008, Wang *et al.* 2018). Působením termoterapie dochází ke snížení koncentrace virových částic v meristémech, které jsou následně izolovány a regenerovány v celé intaktní rostliny. Při modelovém porovnání těchto tří základních výše uvedených metodických přístupů nám v našich předchozích pokusech vycházela u ovocných dřevin z čeledi růžovitých jako nejefektivnější metoda chemoterapie *in vitro* (Paprštejn *et al.* 2011). Jako nejméně efektivní bylo ozdravování pomocí *in vivo* termoterapie zakořeněných rostlin v kontejnerech. Při tomto způsobu ozdravování lze vzhledem k velikosti kontejnerů ozdravovat ve srovnání s terapiemi *in vitro* materiálu na stejné ploše jen malé množství výchozích rostlin. Kontejnerované rostliny nelze ozdravovat celoročně, ale pouze při nástupu vegetace na počátku prodlužovacího růstu. Kromě teploty je navíc dalším stresovým faktorem pro ozdravovanou rostlinu při termoterapii naroubovaného rostlinného materiálu v kontejnerech nutnost sterilizace odebraného růstového vrcholu vstupujícího z nesterilního prostředí jako výchozí explantát do *in vitro* kultur. Toto poškození při sterilizaci způsobuje ztráty potenciálně ozdravených rostlin. *In vivo* ozdravování kontejnerovaných rostlin termoterapií lze doporučit hlavně v případě, kdy je u příslušného druhu nebo genotypu obtížně proveditelné nebo nemožné zavedení do *in vitro* kultury, například z důvodu vnitřní mikrobiální kontaminace (Paprštejn *et al.* 2011).

Chemoterapie

Při chemoterapii ve srovnání s termoterapií odpadá potřeba technicky a finančně náročného zařízení pro dosažení a dlouhodobé udržování vysoké teploty. Chemoterapie probíhá s využitím preparátů s virostatickými účinky zabraňujícími množení viru obvykle v kontrolovaných laboratorních *in vitro* podmínkách. Chemickou látku s virostatickými účinky lze přidat do používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí antibakteriálních mikrofiltrů po autoklavování. Vlastní chemoterapie u rostlin pak probíhá při obvyklé pěstební teplotě 21 až 24 °C v běžné kultivační místnosti v množství desítek opakování na několika metrech čtverečních laboratoře v kultivační místnosti, což zefektivňuje celý proces. Použití chemoterapie proti virovým kontaminacím není doporučováno u experimentů prováděných u zakořeněných rostlin ve volné půdě. Běžný cyklus *in vitro* chemoterapie trvá 7 až 30 dní. Při ozdravování pomocí chemoterapie *in vitro* kultur se po fázi pobytu na médiu s antivirotikem odebírá část *in vitro* vrcholu s meristematickou oblastí. Toto je založeno na předpokladu, že

většina virů není schopna infikovat nově se tvořící primární dělivé pletivo v oblasti vegetačního vzrostného vrcholu. Tento vrchol je tvořen souborem vrcholových iniciál, tvořících meristemický dóm, svrchní tunikou a vnitřním korpusem. Nediferencované pletivo vzrostného vrcholu je velmi málo protkáno vodivými svazky, čímž je částečně chráněno před systémově se šířící virovou infekcí. Z výše uvedeného lze odvodit, že kromě antivirotického působení chemoterapeutika, působí i aseptická izolace meristemického pletiva z růstového vrcholu rostliny a jeho další kultivace k zisku viruprostých explantátů (Kúdela *et al.* 1989, Polák *et al.* 2009).

Během procesu chemoterapie rostliny trpí stresy, které mohou mít za následek nízkou míru přežití, nebo abnormální morfologii. I když *in vitro* kultury přežijí chemoterapeutické ošetření, další vývoj a regenerační schopnost můžou být inhibovány. Citlivost druhů a genotypů na chemoterapii je velmi odlišná a intenzita poškození do značné míry závisí i na fyziologickém stavu rostlin (Sedlák a Paprštejn 2017, Magyar-Tábori *et al.* 2021). Zejména u antivirotických látek cílících na nukleovou kyselinu viru může dojít i k nespecifickému účinku na DNA ozdravované hostitelské rostliny.

Ribavirin

Nejčastěji používanou látkou s chemoterapeutickými účinky u rostlin je ribavirin. Byla u něj prokázána antivirová aktivita proti širokému spektru RNA a DNA virů včetně virů ovocných druhů (James 2001, Cieslinska 2002, Cieslinska 2003, Cieslinska 2007, Sedlák *et al.* 2009, Hauptmanová a Polák 2011, Hu *et al.* 2015, Sedlák *et al.* 2019). Jedná se o syntetický analog guanosinu, někdy též uváděný pod starším názvem virazol (Sidwell *et al.* 1972, Huffman *et al.* 1973, Hansen 1989, Crotty *et al.* 2002). Chemicky se jedná o 1-beta-D-ribofuranosyl-1-2-4-triazole-carboxamid (Faccioli a Marani 1998). Ribavirin byl původně vyvinut k léčbě virových onemocnění v humánní medicíně (Crotty *et al.* 2002). Byl primárně používán k léčbě hepatitidy C, nemocí dýchacích cest a chřipky. V době svého objevu bylo však vzhledem k ceně vyloučeno jeho širší uplatnění pro chemoterapii rostlin. Následně se ale ribavirin stal snadněji dostupným a začal se používat pro širší spektrum rostlinných druhů včetně ovocných plodin. Ribavirin lze přímo přidat do běžně používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí antibakteriálních mikrofiltrů po autoklávování. Koncentrace použité látky se obvykle pohybuje mezi 10 až 50 mg/l. Vlastní chemoterapie pak probíhá při obvyklé pěstební teplotě 21 až 26 °C v běžné kultivační místnosti.

Musíme připustit, že přesný mechanismus protivirového účinku většiny antivirotik nebyl na molekulární úrovni dosud zcela uspokojivě objasněn. Předpokládá se ale podle prací zahraničních autorů (Crotty *et al.* 2002), například u ribavirinu jako nukleotidového analogu: v léčeném organismu ať už je to živočich nebo rostlina dojde metabolizací ribavirinu k vytvoření struktury velmi podobné purinovým RNA nukleotidům. V této formě pak může zasahovat (interferovat) do replikace virové RNA jako náhrada za guanin, nebo i adenin. To způsobuje u viru nesprávné spárování bází a kumulující se chyby v replikaci vlastního virového genomu. To má za následek zpomalení nebo zastavení replikace viru. Dochází ke snížení koncentrace virových částic i pod hranici imunoserologických ELISA nebo velmi citlivých molekulárních metod PCR detekce. Ribavirin lze považovat za unikátní analog guanosinu s širokospektrálním antivirovým účinkem. V současnosti se stále více prosazuje myšlenka více možných mechanismů jeho antivirového účinku na molekulární úrovni (Feld a Hoofnagle, 2005, Nyström *et al.* 2019). Tyto odlišné mechanismy se mohou lišit i v závislosti na použitých koncentracích ribavirinu a také na cílovém viru. Dá se očekávat, že v budoucnu může mít ribavirin nové indikace u zoonotických i rostlinných virů, zvláště když je žádoucí brát v potaz

buněčné faktory viru i hostitelského organismu, nejnověji například u viru SARS-CoV-2 (Mehmet *et al.* 2021).

Dalšími chemoterapeutickými látkami využitými pro chemoterapii u ovocných plodin jsou následující:

Zidovudin (azidothymidin, AZT)

Patří do třídy antiretrovirálních nukleosidových analogů inhibitorů reverzní transkriptázy. Chemicky se jedná o syntetický analog 3'-azido-3'-deoxythymidin. Používá se i v komplexu s dalšími antiviroty proti HIV. Funguje tak, že inhibuje enzymovou reverzní transkriptázu, kterou vir, například HIV složený ze dvou jednořetězcových RNA, používá k syntéze DNA při průniku do hostitelské buňky, a tím snižuje replikaci viru (Wright, 1986, Jeffries, 1989, Tochikura *et al.* 1989). V klinické lékařské praxi byla vzhledem k mechanismu účinku prokázána i aktivita zidovudinu vůči DNA virům jako je hepatitis B (Berk *et al.* 1992). V oblasti ovocných druhů byl podle Pavelkové (2015) úspěšný proti třem RNA virům peckovin *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV) and *Prune necrotic ringspot virus* (PNRSV) s vyšší účinností než referenční ribavirin.

Rimantadin

Chemicky je to cyklický amin 1-(adamantan-1-yl)ethan-1-amine. V oblasti humánní medicíny je používán pro léčbu chřipky typu A. Na trhu je rovněž pod obchodním názvem Flumadine. Objeven byl v roce 1963 (Hannoun, 1988). Přesný mechanismus účinku rimantadinu není plně objasněn. Jeho účinek je předpokládán v inhibici replikačního cyklu viru nebo případně v inhibici tvorby obalového proteinu viru. Předpokládá se, ale i možnost inhibice RNA syntézy jako takové. V České republice byl rimantadin použit u rostlin pro chemoterapii RNA virů PDV a PNRSV u broskvoně na Mendlově univerzitě v Brně (Kudělková *et al.* 2017).

Aciclovir (acyclovir)

Jedná se o ve světě velmi rozšířený antivirotický lék patřící do skupiny syntetických nukleosidových analogů. Chemicky je to 9-[(2-Hydroxyethoxy)methyl]guanine známý též pod synonymy acyclovir nebo acycloguanosine. V humánní medicíně se používá pod různými obchodními názvy např. zovirax, acivir k léčbě oparů způsobených herpesviry (Larsen 2015). Aciclovir účinkuje jako inhibitor virové polymerázy (Gnann *et al.* 1983). U ovocných dřevin byl použit u broskvoně, kdy ve srovnávací studii vykazoval vyšší úspěšnost chemoterapie než rimantadin (Kudělková *et al.* 2017).

Quercetin

Quercetin je přírodní flavonoid, žluté barvivo rostlinného původu s antivirovou aktivitou proti některým rostlinným virům (French a Towers, 1992, Rusak *et al.* 2007). U flavonoidů je předpokládáno několik možných způsobů antivirové aktivity, včetně inhibice syntézy virové RNA. U ovocných dřevin byl quercetin úspěšně použit proti virovému patogenu *Apple stem grooving virus* (ASGV) u jabloně (James, 2001).

ZÁVĚR

Při ozdravování je nutno zohlednit skutečnost, že diagnostika patogenů u ovocných dřevin je velmi obtížná vzhledem k nízké koncentraci a nerovnoměrnému výskytu virových částic

v rostlinách, přítomnosti inhibičních látek a obtížné homogenizaci pletiv (Špak *et al.* 2010). Při chemoterapii může dojít ozdravováním pouze k dočasnému snížení koncentrace virových částic pod hranici detekce použitými diagnostickými metodami. Tento jev pouze dočasného snížení koncentrace virových částic byl zaznamenán i v zahraničních pokusech v případě *in vitro* ozdravování ovocných dřevin od virů ACLSV (*Apple chlorotic leaf spot virus*), ASGV a PPV (Knapp *et al.* 1998). Při dalším *in vitro* množení a po převodu do *ex vitro* podmínek se pak virus může opětovně namnožit. Z tohoto důvodu je nutno opakovaně testovat a dlouhodobě sledovat i ozdravený materiál ovocných dřevin. Převedené ozdravené rostliny musí být přitom pěstovány v uzavřených pěstebních nádobách v technické izolaci, která vylučuje zpětnou reinfekci již ozdraveného materiálu.

Na základě výsledků ozdravování různých výzkumných pracovišť lze konstatovat, že rozdílná úspěšnost chemoterapie může souviset se specifickou interakcí mezi virovým patogenem a konkrétním genotypem – odrůdou ovocné plodiny jako hostitelem. Účinnost chemoterapie může být také ovlivněna koncentrací viru ve výchozím rostlinném materiálu a kmenem viru. Z tohoto důvodu je potřeba provádět výzkum chemoterapie až na úroveň konkrétního druhu a genotypu. U materiálu prošlého termoterapií nebo chemoterapií je dále nutná kontrola dlouhodobější genetické stability, protože vyšší koncentrace antivirotika v pěstebním médiu, může u geneticky méně stabilních odrůd podporovat vyšší frekvenci výskytu somatických mutací.

PODĚKOVÁNÍ

Při zpracování této studie bylo využito institucionální podpory DKRVO Ministerstva zemědělství České republiky RO1522 a projektu NAZV QK1910065.

LITERATURA

- AGRIOS, G. *Plant Pathology*. 5. vyd. San Diego: Elsevier Academic Press. 2005, 952 s.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*. 1971, 35 (3), 235–41.
- BALTIMORE, D. The strategy of RNA viruses. *Harvey Lectures*. 1974, 70: 57–74.
- BERK L, S.W. SCHALM and R.A. HEIJTINK. Zidovudine inhibits hepatitis B virus replication. *Antiviral Research* 1992, 19(2):111–8. DOI: 10.1016/0166-3542(92)90070-I.
- CIESLINSKA, M. Elimination of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) from Pear by *In vitro* Thermo-therapy and Chemotherapy. *Acta Horticulturae*. 2002, 481–484. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.80.
- CIESLINSKA, M. Elimination of strawberry mottle virus (SMoV) from *Fragaria virginiana* UC-11 indicator plants by thermo-therapy and chemotherapy. *Phytopatologia Polonica*. 2003, 30: 51–59.
- CIESLINSKA, M. Application of thermo-therapy and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2007, 15: 117–124.
- CROTTY, S., C. CAMERON and R. ANDINO. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *Journal of Molecular Medicine*. 2002, 80(2): 86–95.
- DESIGNES, J.C. *Virus diseases of fruit trees*. Editions Centre technique interprofessionnel des fruits et legumes. Paříž, 1999, 202 p.

- DZIEDZIC, E. Elimination of *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2008, 16: 101–109.
- FACCIOLI, G. and F. MARANI. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi, A. *et al.* (ed) *Plant Virus Disease Control*, St. Paul: APS, 1998: 346–380.
- FELD, J.J. and J.H. HOOFNAGLE. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005, 436(7053): 967–972.
- FRENCH, CH. and G.H.N. TOWERS. Inhibition of infectivity of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry*. 1992, 31(9): 3017–3020. DOI: 10.1016/0031-9422(92)83438-5.
- GELLA, R. and P. ERREA. Application of *in vitro* therapy for ilarvirus elimination in three *Prunus* species. *Journal of Phytopathology*. 1998, 146:445–449.
- GNANN, J.W., N.H. BARTON and R.J. WHITLEY. Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1983, 3(5): 275–283. ISSN: 1875-9114.
- HANNOUN, C. Rimantadine in the prevention and treatment of influenza A. *Revue de Médecine Interne*. 1988, 9(5): 554–8. DOI: 10.1016/s0248-8663(88)80024-9.
- HANSEN, A.J. Antiviral chemicals for plant diseases control. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1989, 8(1): 45-48.
- HU, G., Y. DONG, Z. ZHANG *et al.* Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015, 121: 435–443. DOI: 10.1007/s11240-015-0714-6.
- HUFFMAN, J.H., R.W. SIDWELL, G.P. KHARE, J.T. WITKOWSKI, L.B. ALLEN and R.K. ROBINS. *In vitro* effect of 1- β -D-ribofura-nosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1973, 3: 235–241.
- HULL, R. *Plant Virology*. 5. vyd. London: Elsevier Academic Press, 2014, 1104 p.
- JANECKOVA, M., J. MYSLIVECKOVA and L. SVOBODOVA. Elimination of Plum pox virus from plum Eruni rootstock by combination *in vitro* thermotherapy with *in vitro* apical shoot cultures. *Scientific Papers of Pomology* 1999, 16: 53–58.
- JAMES, D. Long term assessment of the effect of *in vitro* chemotherapy as a tool for apple stem grooving virus elimination. *Acta Horticulturae*. 2001, 550: 459–462.
- JEFFRIES, D.J. Zidovudine resistant HIV. *British Medical Journal*. 1989, 298(6681): 1132–1133. ISSN 1756-1833.
- KNAPP, E., V. HANZER, H. WEISS, A. DA CÂMARA MACHADO, H. KATINGER and M. LAIMER DA CÂMARA MACHADO. Characteristics of large-scale production of phytosanitary improved *in vitro* fruit tree cultivars using *in vitro* elimination treatments and serodiagnostics. In: *Dehne H-W et al. (eds) Diagnosis and identification of plant pathogens*. Kluwer Academic. 1997: 141–147.
- KNAPP, E., V. HANZER, D. MENDONCA, A. DA CAMARA MACHADO, H. KATINGER and M. LAIMER DA CAMARA MACHADO. Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1998, 52: 3–6.
- KOONIN, E.V. and P. STAROKADOMSKY. Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences*. 2016, 59: 125–134. DOI: 10.1016/j.shpsc.2016.02.016.
- KÚDELA, V., *et al.* *Obecná fytopatologie*. Academia Praha, 1989, 387 s.

- KUDĚLKOVÁ, M., R. PAVELKOVÁ and E. ONDRUŠIKOVÁ, E. Virus elimination in peach using chemotherapy. *Acta Horticulturae*. 2017, 1155: 431–438. DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1155.64.
- LARSEN, F. *Aciclovir*. *DermNet NZ* [online]. © 2015 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <http://www.dermnetnz.org/treatments/aciclovir.html>.
- MAGYAR-TÁBORI, K, N. MENDELER-DRIENYOVSZKI, A. HANÁSZ, L. ZSOMBIK, AND J. DOBRÁNSZKI. Phytotoxicity and Other Adverse Effects on the *In vitro* Shoot Cultures Caused by Virus Elimination Treatments: Reasons and Solutions. *Plants*. 2021, 10: 670. DOI: 10.3390/plants10040670.
- MANGANARIS, G.A., A.S. ECONOMOU, I.N. BOUBOURAKAS and N.I. KATIS. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Reports*. 2003, 22: 195–20.
- MEHMET, A.T.U., C.V. BITIRIM, G.Y. SUMMAK, S. BERKETOGLU, I. C. ZEYTIN, O.BESINBAR, C. GURCAN, D. AYDOS, E. GOKSOY, E. KOCAKAYA, Z. ERAN, M. MURAT, N. DEMIR, Z.B.A. OZER, J. SOMERS, E. DEMIR, H. NAZIR, S. A. OZKAN, A. OZKUL, A. AZAP, A. YILMAZER and K.C. AKCALI. Ribavirin shows antiviral activity against SARS-CoV-2 and downregulates the activity of TMPRSS2 and the expression of ACE2 *in vitro*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2020, 99(5): 449–460. DOI: 10.1139/cjpp-2020-0734.
- MINK, G.I., R. WAMPLE and W.E. HOWELL. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival. In: *Hadidi A (ed) Plant virus disease control*. 1998, St. Paul, Minnesota, USA.
- NAGY, P.D. and J. POGANY. Replication of plant RNA viruses. In: *CARANTA C., et al. Recent Advances in Plant Virology*. 2011: 19–46. ISBN 978-1-904455-75- 2.
- NÉMETH, M. *Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees*. M. Nijhoff/Dr. W. Junk, 1984.
- NOVÁK, F. *Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin*. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-0344-4.
- NYSTRÖM, K., J. WALDENSTRÖM, K.W. TANG and M. LAGGING. Ribavirin: pharmacology, multiple modes of action and possible future perspectives. *Future Virology*. 2019, 14(3): 153–160.
- PAVELKOVÁ, R., M. KUDĚLKOVÁ, E. ONDRUŠIKOVÁ and A. EICHMEIER. Virus Elimination in Peach cv. 'Red Haven' by Chemotherapy. *Agricultural Communications*. 2015, 3(2):16–20. Dostupné z: http://www.agricommun.com/content/archive%20volumes/volume%203_2/Agri.%20Commun.%203_2_3.pdf.
- PAPRSTEIN, F., J. SEDLAK, J. POLAK *et al.* Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008, 94: 347–352. DOI: 10.1007/s11240-008-9342-8.
- PAPRSTEIN, F., J. SEDLAK, J. POLAK *et al.* Elimination of viruses from fruit woody species and long term observation of health status. *Vědecké Práce Ovocnářské*. (22): 35–44.
- POLÁK, J., F. PAPRŠTEIN, B. KŘIŽAN B *et al.* *Metodika ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a in vitro kultur*. Holovousy: VŠÚO, 2009, 68 s.
- RAM, R., N. VERMA, A. SINGH, L. SINGH, V. HALLAN and A.A. ZAID. Indexing and production of virus-free Chrysanthemums. *Biol. Pl.* 2005, 49: 49–152. ISSN: 1573-8264.
- ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie 3. Molekulární biologie virů*. Brno: Stanislav Rosypal, 2000: 604–900. ISBN 80-902-5622-8.

- RUSAK, G., M. KRAJAČIĆ, M. KRŠNIK-RASOL and H.O. GUTZEIT. Quercetin influences response in *Nicotiana megalosiphon* infected by satellite-associated cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2007, 114(4): 45–150.
- SEDLÁK, J. and F. PAPRŠTEIN. Fytotoxicita antivirotika ribavirin u *in vitro* kultur třešně. *Vědecké práce ovocnářské*. 2017, (25): 123–127.
- SEDLÁK, J., F. PAPRŠTEIN and J. SUCHÁ. Influence of chemotherapy on development and production of virus free *in vitro* strawberry plants. *Horticultural Science*. 2019, 46(2): 53–56. DOI: 10.17221/249/2017-HORTSCI.
- SIDWELL, R.W., J.H. HUFFMAN, G.P. SHARE, L.B. ALLEN, J.T. WITKOWSKI AND P.K. ROBINS. Broad spectrum antiviral activity of virazole 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*. 1972, 177: 705–706.
- ŠPAK, J., J. PŘIBYLOVÁ, D. KUBELKOVÁ, J. SEDLÁK, F. PAPRŠTEIN and L. SVOBODOVÁ. Výskyt virů v odrůdách rybízu. *Zahradnictví*, 2010, (8): 14–16.
- TOCHIKURA, T.S., H. NAKASHIMA and N. YAMAMOTO. Antiviral agents with activity against human retroviruses. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1989, 2(5): 441–7.
- WANG, L., G. WANG, N. HONG, R. TANG, X. DENG and H. ZHANG. Effect of thermotherapy on elimination of apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus for *in vitro*-cultured pear shoot tips. *HortScience*. 2006, 41(3): 729–732.
- WANG, M.R., Z.H. CUI, J.W. LI *et al.* *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*. 2018, 14: 87. DOI: 10.1186/s13007-018-0355-y.
- WRIGHT, K. AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature*. 1986, 323(6086): 283. ISSN: 0028-0836.