

Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Branišovská 1160/31  
370 05 České Budějovice  
ID DS: r84nds8

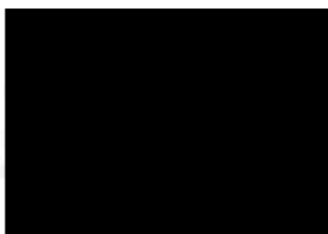
**Žádost o poskytnutí informací na základě  
zákona č. 106/1999 Sb. o svobodném přístupu k informacím**

Oddělení rostlinné virologie Biologického centra AV ČR, v.v.i. se zabývá mj. výzkumem virů rostlin. Tématem viru tabákové mozaiky, jakožto původce onemocnění mozaiky tabáku, se zabýval pracovník oddělení rostlinné virologie Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D. v přednášce „[Kde se tady berou? Vznikl Covid v labu?](#)“ na YouTube kanále Biologického centra AV ČR, v.v.i., ve které např. uvedl, že virus mozaiky tabáku byl vyizolován v roce 1935. Ve své přednášce bohužel neuvedl žádné vědecké práce, ze kterých vycházel.

Uveďte, prosím, vědecké důkazy, ze kterých Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D. ve své přednášce čerpal. Uveďte pouze primární informační prameny, tedy původní vědecké studie.

- 1. Uveďte vědeckou práci, včetně konkrétních citací z ní, ve které je popsána izolace viru tabákové mozaiky v roce 1935.**
- 2. Uveďte vědeckou práci, včetně konkrétních citací z ní, která pomocí vědecké metody prokázala, že původcem mozaiky tabáku je virus tabákové mozaiky.**
- 3. Uveďte vědeckou práci, včetně konkrétních citací z ní, která pomocí vědecké metody prokázala existenci viru tabákové mozaiky.**
- 4. Uveďte vědeckou práci, včetně konkrétních citací z ní, která pomocí vědecké metody prokázala, že virus tabákové mozaiky je přenosný přirozeným způsobem na další rostliny.**

Předem děkuji



V [redacted] dne 14.02.2023

[REDACTED]

Vážená paní [REDACTED],

ve vaší žádosti ze dne 14.2.2023 zazněly 4 otázky týkající se vědeckých publikací dokazujících - zjednodušeně - existenci viru mozaiky tabáku (TMV), jeho izolaci, přenosnost a také schopnost způsobovat mozaiku tabáku. Zároveň v každé odpovědi požadujete uvést **“vědeckou práci, včetně konkrétních citací z ní”**, která by daný fakt dokládala. U tohoto požadavku musím upozornit, že věda je soubor vzájemně propojených poznatků, stojících vždy na předchozím zkoumání, jehož výsledky rozšiřuje, ověřuje z jiného úhlu, popř. je upravuje nebo vyvrací. Z tohoto důvodu tedy má odpověď nebude zahrnovat **jednu** vědeckou práci, ale více prací, které na sebe navazují a jako celek odpovídají na vaši otázku (uvedu jen ty zásadnější). Z důvodů logiky plynutí textu budu postupovat od celku k detailu: nejprve se budu věnovat důkazům existence viru (otázka 3) a to, že je původcem mozaikové choroby tabáku (otázka 2), v rámci tohoto celku budou pak rozebrány i izolace/purifikace viru TMV v roce 1935 (otázka 3) a jeho přenosnost (otázka 4).

Nejdříve uvádím krátké shrnutí důkazů pro existenci viru, které poté rozebírám níže. Reference na konci obsahují i další, v textu necitovanou literaturu vhodnou pro zjištění dalších informací. Na webu Biologického centra připravuji v návaznosti na váš dotaz článek, který bude rozebírat celou problematiku podrobněji.

S pozdravem

Mgr. Ondřej Lenz, PhD.

V Českých Budějovicích dne 1.3.2023

#### **Krátké shrnutí zásadních bodů pro existenci viru TMV a jeho dotazované vlastnosti:**

- chorobu mozaiku tabáku je možné vyvolat šťávou pouze z nemocné rostliny - šťáva ze zdravých rostlin chorobu nevyvolává, stejně tak ani jejich prosté mechanické poškození (ani člověkem, ani hmyzem), původce choroby je menší než bakterie
- z nemocných rostlin byly izolovány, přečištěny a krystalizovány částice, jejichž opětovná inokulace do rostlin vedla k infekci. Purifikát viru byl zároveň 100-1000x infekčnější než pouhá filtrovaná šťáva
- purifikované infekční částice (virus) se skládají z RNA obalené velkým počtem identických kopií jednoho jediného proteinu - infekci vyvolává virová RNA, nikoliv protein.

Zároveň RNA z různých variant (kmenů) viru TMV vyvolávají různé příznaky, i když jsou obaleny proteinem z jiného kmene viru

- Virus TMV je přenosný tzv. "mechanicky" - tj. virové částice mohou vniknout do rostliny v místě poranění, popř. mohou být přenosné z nemocné rostliny roubováním, či jiným propojením pletiv dvou různých rostlin. Virus TMV byl zjištěn v půdě nemocných rostlin i v povrchových či odpadních vodách

### **Podrobnější odpověď:**

Viry jsou miniaturní balíčky genetické informace, která se množí v buňkách. Mimo buňku tyto balíčky neprokazují žádné životní pochody, řada z nich (zejména neobalené rostlinné viry) se dá i vykrystalizovat - podobně, jako např. solný roztok, i když postupy krystalizace jsou v tomto případě rozdílné. Viry jsou tedy takoví neživí buněční parazité, množící se díky energii a "vybavení" buněk, které sami nemají. Množení viru je pro buňky energeticky náročné a často vede i k jejich poškození (další poškození může způsobit i vlastní obranná reakce organismu) - v řadě případů tedy množení viru vyvolá nějakou chorobu. Řada virů je schopna množit se i relativně "nenápadně", bez vyvolání nějakých příznaků na úrovni organismu - na úrovni buněk jsou ale důsledky množení většinou viditelné a je evidentní, že virus je pro buňku cizorodý element, který se množí a šíří na jejich úkor, čemuž se buňky i celý organismus snaží bránit.

Mozaiková choroba tabáku, způsobená virem mozaiky tabáku (Tobacco mosaic virus, TMV) byla popsána už na přelomu 19. a 20. století, jaké jsou tedy důkazy, že za vznikem a šířením této choroby stojí částičky výše popsaných vlastností, do té doby neznámé?

#### **1.) chorobu mozaiku tabáku je možné vyvolat šťávou pouze z nemocné rostliny - šťáva ze zdravých rostlin chorobu nevyvolává, stejně tak ani jejich prosté mechanické poškození (ani člověkem, ani hmyzem), původce choroby je menší než bakterie**

- mezi prvními, kdo na přelomu 19. a 20. století objevil infekčnost mozaiky tabáku (schopnost choroby šířit se z nemocných rostlin na zdravé) byli Adolf Eduard Mayer (citace), Dmitri Iosifovich Ivanovsky (citace) a Martinus Willem Beijerinck (citace)
- nezávisle na sobě provedli celou řadu experimentů, pro odpověď na výše položenou otázku jsou zásadní tato zjištění:

##### **a) původce choroby prochází bakteriálními filtry:**

"Yet I have found that the sap of leaves attacked by the mosaic disease retains its infectious qualities even after filtration through Chamberland filter-candles" (Ivanovsky, 1892)

**“Zunächst ergab sich, dass der Saft kranker Pflanzen, über Porzellan filtriert, wodurch alle Aëroben zurückgehalten wurden, infectionsfähig bleibt.** Doch habe ich mich dabei nicht mit dem Suchen nach Aëroben allein beschäftigt, sondern auch mühevoll Versuche für den Nachweis von Anaëroben im Bougiesaft ausgeführt, **allein mit negativen Resultate, sodass der verwendete Saft vollständig steril erschien.**” (Beijerinck, 1898)

(Překlad: **“Nejprve se ukázalo, že míza nemocných rostlin, filtrovaná přes porcelánové fitry, které by zadržely všechny aerobní organismy, zůstává schopná vyvolat infekci.** Nezabýval jsem se však pouze hledáním těchto aerobních organismů, ale prováděl jsem i pracné testy na zjištění anaerobních látek ve filtrované šťávě, **pouze s negativními výsledky, takže použitá šťáva působila zcela sterilně.**”

b) chorobu vyvolává pouze šťáva nebo filtrát z nemocných rostlin - šťáva ze zdravých rostlin chorobu nevyvolávala:

**“Sap from healthy plants does not produce the disease, as I have proved experimentally** - although to some it may seem superfluous to have tried this.” (Mayer, 1886)

“Ebenso wenig kann ich die neueste Angabe von Woods bestätigen, nach welcher die Ansteckung mit der Mosaikkrankheit auch bei Impfung mit Saft gesunder Pflanzen geschieht. **In meinen Versuchen entwickelte sich die Krankheit unter solchen Bedingungen nie.**” (Ivanovsky, 1903; v reakci na práci Woodse z roku 1899)

(Překlad: “Nemohu potvrdit ani poslední Woodsovo tvrzení, podle kterého k nákaze mozaikovou chorobou dochází i při očkování šťávou zdravých rostlin. **V mých experimentech se nemoc za takových podmínek nikdy nerozvinula.**”)

c) obdobné výsledky dávaly experimenty s přenosem dalších virových chorob:

- pro ilustraci uvádím, že tyto výsledky byly potvrzeny později i v dalších pracech zabývajících se přenosem virových chorob ještě před průkazem virových částic, např. při pokusech o přenos podobné “mozaikové choroby brambor” z bramboru na rajčata (Smith, 1929), když před tím testoval, zda stejnou chorobu nevyvolá očkování šťávy ze zdravých rostlin:

“The inoculated plants were held for at least four weeks, in some cases for six weeks or more. **In no case was any disease produced in the tomatoes.** In several instances leaves were taken from the inoculated tomatoes and again inoculated into a second generation of six to eight young tomatoes **without producing any symptoms in them.** I

**have had no case where a potato, which had been shown to be normal on preliminary testing, produced disease in tomato.**

It seems clear that in this country and with these varieties of potato, **potato protoplasm as such does not produce virus disease in tomato**, and it is reasonable to suppose that the same would hold good of other varieties as well.”

(Překlad: “Inokulované rostliny byly udržovány po dobu alespoň čtyř týdnů, v některých případech po dobu šesti týdnů nebo déle. **V žádném případě se u rajčat nevyskytla žádná choroba.** V několika případech byly z naočkovaných rajčat odebrány listy a znovu naočovány do druhé generace šesti až osmi mladých rajčat, **aniž by se u nich projevily jakékoli příznaky. Nezaznamenal jsem žádný případ, kdy by brambor, který se předběžným testováním ukázal jako normální, způsobil onemocnění v rajčatech.**

Zdá se jasné, že v této zemi a u těchto odrůd brambor bramborová protoplazma jako taková nevyvolává virovou chorobu u rajčat a je rozumné předpokládat, že totéž by platilo i pro jiné odrůdy.”)

Mozaiku bramboru vyvolávala ale velmi ochotně a jednoznačně šťáva z nemocných brambor:

“On the other hand, **leaves from mosaic potatoes have invariably produced in tomato a definite disease, and up to the present all the inoculated tomatoes have shown it**”.

(Překlad: Na druhé straně **listy z mozaikových brambor vždy způsobily v rajčatech jednoznačnou chorobu a až dosud to vykazovala všechna naočkovaná rajčata**“.)

d) chorobu vždy vyvolávají látky, které ve zdravých rostlinách nejsou přítomny - protilátky proti virům nereagují se šťávou ze zdravých rostlin

- jen pro ilustraci uvádím odkazy na experimenty s imunizací a tvorbou protilátek - šťáva z nemocné i zdravé rostliny vyvolává vždy tvorbu protilátek proti všem možným bílkovinám, popř. i dalším látkám obsaženým ve šťávě. Tyto protilátky (séra) se ale liší, část séra vytvořeného proti šťávě nemocných rostlin nereaguje se šťávou z nemocných rostlin - sérum proti nemocné rostlině tedy obsahuje něco “navíc”, co není přítomno ve zdravých kytkách (Dvorak, 1927; Purdy, 1929, Beale, 1931).
- Pozn: vidíme tedy, že vědci v prvních pracích explicitně zmiňují kontrolní experimenty i se zdravými rostlinami, které mozaiku nikdy nevyvolaly - protože u nich přenos proběhl stejným způsobem, příčinou choroby tedy nemůže být prosté mechanické poškození rostlin při inokulaci. Tvrzení na stránkách Resetheus.org o tom, že v těchto prvních pracech “nebyly provedeny žádné kontrolní experimenty” (se zdravými rostlinami) je

nepravdivé. Přítomnost nějaké infekční částice, která není součástí rostlin naznačovaly v této době už i serologické studie.

**2.) z nemocných rostlin byly izolovány, přečištěny a krystalizovány částice, jejichž opětovná inokulace do rostlin vedla k infekci. Purifikát viru byl zároveň 100-1000x infekčnější než pouhá filtrovaná šťáva**

- v roce 1935 Stanley publikoval shrnutí svých dosavadních experimentů - ze šťávy z nemocných rostlin purifikoval částice, které chorobu vyvolávaly. Kromě toho zjistil, že:

a) tyto částice (virus) jsou 1000x infekčnější než původní filtrovaná šťáva:

“The crystals are over **100 times more active** than the suspension made by grinding up diseased Turkish tobacco leaves, and about **1,000 times more active** than the twice-frozen juice from diseased plants. One cubic centimeter of a 1 to 1,000,000,000 dilution of the crystals has usually proved infectious.”

b) opětovné potvrzení průchodu viru bakteriálními filtry, virus je ale zadržen nitrocelulózovými filtry, které ale propouští např. velkou molekulu vaječného albuminu - tekutina po takové filtraci je neinfekční a zároveň neobsahuje TMV částice. Vidíme, že chorobu tak nemohou vyvolat potenciálně menší molekuly nečistot, které teoreticky v purifikátu viru stále mohou být:

“That the **molecule is quite large** is also indicated by the fact that the protein is held back by collodion filters through which proteins such as egg albumin readily pass. **Collodion filters which fail to allow the protein to pass also fail to allow the active agent to pass.** The material readily passes a Berkefeld "W" filter.”

c) virus TMV byl purifikován čistě a nejsou zde žádné příměsi, které se vyskytují v buňkách běžně a vyvolávaly by reakci protilátek (kdyby zde byly, zvířata injikovaná roztokem krystalů by vytvořila protilátky i proti nim, sérum by pak reagovalo i s roztokem ze zdravé rostliny - to se ale nedělo). Zároveň je to důkaz, že virus se vyskytuje pouze v nemocných rostlinách:

“The sera of animals injected with tobacco-mosaic virus give a precipitate when mixed with a solution of the crystals diluted as high as 1 part in 100,000. **The sera of animals injected with juice from healthy tobacco plants give no precipitate when mixed with a solution of the crystals.** Injection of solutions of the crystals into animals causes the production of a precipitin that is **active for**

**solutions of the crystals and juice of plants containing tobacco-mosaic virus but that is inactive for juice of normal plants.”**

- virus také nebyl nikdy izolován ze zdravých kytek ani v dalších studiích, např. Stanleyho studie z roku 1937 (Stanley, 1937), v níž testoval citlivost své metody detekce a zkoumal, zda lze vyizolovat stejné viry/proteiny i zpětně ze šťávy zdravých kytek (označuje ji jako “normal juice”), když do ní přidá purifikovaný (přečištěný) virus. Jako kontrola sloužila stejná šťáva bez přídavku viru - ta virus nikdy neobsahovala:

**“No virus protein was obtained from the normal juice preparation to which no virus protein had been added,..”**

(Překlad: **“Žádný virový protein nebyl získán z normální šťávy, do které před tím nebyl žádný virový protein přidán, ...”**)

*Pozn: protože virus se dal vykrytalizovat podobně jako jiné proteiny, považoval ho Stanley nejprve za čistý protein. Až později sám ověřil, že jde o kombinaci RNA a proteinu (viz dále)*

- stejný protein/virus byl izolován a přečištěn z rajčat infikovaných původním TMV (Loring a Stanley, 1937). Opět byl daleko infekčnější než surový filtrát z nemocných rostlin:

**“This crystalline protein was obtained from the globulin fraction of extracts of diseased Turkish tobacco plants, and was found to be over 100 times as active as the crude juice from the diseased plants used as starting material. The chemical composition, optical rotation, and infectivity of the crystalline protein remained unchanged after ten successive recrystallizations. These facts have suggested that the protein is essentially pure and is the agent responsible for the tobacco mosaic disease.”**

(Překlad: “Tento krystalický protein byl získán z globulinové frakce extraktů nemocných rostlin tureckého tabáku a bylo zjištěno, že je **více než 100krát tak aktivní než surová šťáva z nemocných rostlin** použitá jako výchozí materiál. Chemické složení, optická rotace a infekčnost krystalického proteinu zůstaly nezměněny po deseti po sobě jdoucích rekrystalizacích. Tyto skutečnosti naznačují, že **protein je v podstatě čistý a je činitelem odpovědným za onemocnění tabákové mozaiky.**”)

- jako doplnění k předchozím důkazům: to, že za infekci může skutečně onen vykrytalizovaný protein podpořil Stanley v roce 1936 (Stanley, 1936) také studií, ve které prokázal, že vykrytalizovaný virus lze inaktivovat chemickými činidly nebo UV-světlem. “Protein” je mírně modifikovaný, ale není schopen vyvolat chorobu po inokulaci na tabák (narozdíl od neinaktivovaného “proteinu”) ani ho poté není možné z inokulovaného tabáku vyizolovat. To, že purifikované viry lze takto fyzikálně/chemicky inaktivovat, a že to tedy jsou částice, které způsobují příslušnou chorobu, potvrzují i

současné experimenty s dalšími viry (např. Jeong a Choi, 2017; nebo Predmore a kol., 2015)

**3.) purifikované infekční částice (virus) se skládají z RNA obalené velkým počtem identických kopií jednoho jediného proteinu - infekci vyvolává virová RNA, nikoliv protein. Zároveň RNA z různých variant (kmenů) viru TMV vyvolávají různé příznaky, i když jsou obaleny proteinem z jiného kmene viru**

- Cohen a Stanley (1942) prokázali poprvé, že součástí virionů TMV je RNA, izolovali ji a proměřili další charakteristiky:

**“Protein-free ribosenucleic acid has been isolated from heat-denatured tobacco mosaic virus.”**

- Hart (1955) potvrdil tuto skutečnost pomocí elektronového mikroskopu a štěpením RNázou (pomocí ní odštěpil přesahující vlákna z natrávených virionů):

**“The ribonucleic acid in tobacco mosaic virus appears to be localized in a central core running the length of the rod-shaped virus particle.** This conclusion is based on (a) observation of partially degraded particles from which project fibers some 30-40 Å in diameter; (b) lability, of the fibers fil trace concentrations of ribonuclease; (c) observation of a hole or channel at the center of short rods of X-protein, which contains no nucleic acid.”

- infekčnost RNA prokázal také Fraenkel-Conrat (1955, 1956). Zároveň vytvořil hybridní virus, za použití dvou různých proteinů TMV (ze dvou různých kmenů TMV), které se lišily o několik aminokyselin. S nimi zkombinoval RNA z několika různých kmenů a ponechal složit/rekonstituovat v roztoku tak, jak bylo dříve provedeno. Jednotlivé kombinace vyvolávaly v rostlinách vždy ty příznaky, které byly charakteristické pro kmen použité RNA (nikoliv proteinu), pokud ale byla použita degradovaná nebo zkrácená RNA, vzniklé částice infekční nebyly:

**“Freshly prepared RNA is required for appreciable reaction; degraded RNA, or nucleic acids from other sources, are inactive.”**

- o rok později udělal Fraenkel-Conrat spolu s Singerem (1957) podobný experiment dokonce se 4 různými kmeny TMV, pokaždé množící se virus vykazoval vlastnosti toho viru, ze kterého byla použita RNA:

**“These findings strongly suggest that the nucleic acid is the genetic determinant in TMV, and related strains, playing the same decisive role which DNA seems to play in the bacteriophages.”**

- Ke stejným závěrům o infekčnosti RNA došli např. i Gierer a Schramm (1956) nebo Holoubek (1962) a podobné “sestavovací” experimenty byly provedeny i s dalšími viry - např. Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV - Bancroft a Hiebert, 1967), když před tím tento virus purifikovali (Bancroft a kol., 1967)

#### 4.) Virus TMV je přenosný tzv. “mechanicky” - tj. virové částice mohou vniknout do rostliny v místě poranění, popř. mohou být přenosné z nemocné rostliny roubováním, či jiným propojení pletiv dvou různých rostlin. Virus TMV byl zjištěn v půdě nemocných rostlin i v povrchových či odpadních vodách

- kromě mechanického přenosu popsaného ve výše uvedených bodech, a který v přírodě jistě může nastat při vzájemném otěru rostlin (např. ve větru), popř. jejich mechanickému poškození, je významným přenašečem viru v současnosti člověk, při práci s rostlinami (poškození nemocných i zdravých rostlin stejným nářadím bez předchozí dezinfekce - infekčnost šťávy z nemocných rostlin byla prokázána výše)
- nadto bylo zjištěno, že virus je vylučován do půdy kořeny, i když jeho následný příjem zdravou rostlinou je pouze v případě propojení kořenových systémů u sebe rostoucích rostlin (Park a kol., 1999):

“The analysis of the virus concentration in the nutrient solution showed that though **the inoculum source plants released virus through their roots**, the released virus concentration in the nutrient solution did not reach a high enough concentration to be the minimum for infection. This might be the reason that the separated test plants did not become infected. However, **when test plants and inoculum source plants were grown together side by side, their roots made contact and root-tips grafted with each other**. It might be possible that the virus could move from diseased plants to healthy plants through a root-tip graft so that the tested plants become inoculated.”

- infekční virus byl taktéž izolován z povrchových vod, a po inokulaci na rostliny se v řadě případů objevily příznaky typické choroby TMV, virus byl poté v rostlině dokázán dalšími metodami jako RT-PCR, real-time PCR, ELISA a elektronová mikroskopie (např. Tošić a Tošić, 1984; nebo Boben a kol., 2007)

“Plant tissue was analysed using quantitative ToMV-specific real-time PCR. The plants which had been watered with a diluted elution fraction tested ToMV-positive with an estimate concentration of  $4.0 \times 10^{-9}$  mg ml<sup>-1</sup>. The concentration of ToMV in plants watered with original irrigation water from the gravel pit in Ivanci was estimated to be at the limit of detection (LOD) for the method:  $4.2 \times 10^{-10}$  mg ml<sup>-1</sup>. The plants used as a control had Ct values below those corresponding to our LOD in the test.” (Boben a kol., 2007)”

Tyto studie samozřejmě nepřinášejí přímý důkaz, že virus byl takto přenesen v konkrétních případech infekcí v zahradách, sklenících nebo polích, ale ilustrují dostatečně možnost, že k takovému přenosu může dojít i přirozenou cestou.

### **Odkazy:**

Agbeci M, Grangeon R, Nelson RS, Zheng H, Laliberté JF. Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003683. doi: 10.1371/journal.ppat.1003683

Allard, H. A. The mosaic disease of tobacco. 1912. *Science* II. 36: 875, 876.

Bancroft JB, Hiebert E. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. *Virology.* 1967 Jun;32(2):354-6. doi: 10.1016/0042-6822(67)90284-x.

Bancroft JB, Hills GJ, Markham R. A study of the self-assembly process in a small spherical virus. Formation of organized structures from protein subunits in vitro. *Virology.* 1967 Feb;31(2):354-79. doi: 10.1016/0042-6822(67)90180-8

Beale HP. SPECIFICITY OF THE PRECIPITIN REACTION IN TOBACCO MOSAIC DISEASE. *J Exp Med.* 1931 Sep 30;54(4):463-73. doi: 10.1084/jem.54.4.463. PMID: 19869933; PMCID: PMC2132021.

Boben, J., Kramberger, P., Petrovič, N. et al. Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *Eur J Plant Pathol* 118, 59–71 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9112-1>

COMMONER B, SHEARER GB, YAMADA M. Linera biosynthesis of tobacco mosaic virus: changes in rod length during the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Oct 15;48(10):1788-95. doi: 10.1073/pnas.48.10.1788

Dáder B, Burckbuchler M, Macia J-L, Alcon C, Curie C, Gargani D, et al. (2019) Split green fluorescent protein as a tool to study infection with a plant pathogen, Cauliflower mosaic virus. *PLoS ONE* 14(3): e0213087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213087>

Davidson JG. INFECTIVITY OF EXTRACTED, UNPRESERVED TOBACCO MOSAIC VIRUS RETAINED 28 YEARS. *Science.* 1942 May 8;95(2471):479-80. doi: 10.1126/science.95.2471.479

Dvorak, M., The effect of mosaic on the globulin of potato, J. Infect. Dis., 1927,xli, 215-221.

Cohen SS, Stanley WM. The molecular size and shape of the nucleic acid of tobacco mosaic virus. J Biol Chem. 1942;144:589–98

FRAENKEL-CONRAT H, SINGER B. Virus reconstitution. II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. Biochim Biophys Acta. 1957 Jun;24(3):540-8. doi: 10.1016/0006-3002(57)90244-5

Fraenkel-Conrat H, Williams RC. RECONSTITUTION OF ACTIVE TOBACCO MOSAIC VIRUS FROM ITS INACTIVE PROTEIN AND NUCLEIC ACID COMPONENTS. Proc Natl Acad Sci U S A. 1955 Oct 15;41(10):690-8. doi: 10.1073/pnas

GIERER, A., & SCHRAMM, G. (1956). *Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus. Nature, 177(4511), 702–703.* doi:10.1038/177702a0

HERSHEY AD, CHASE M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J Gen Physiol. 1952 May;36(1):39-56. doi: 10.1085/jgp.36.1.39

Hart RG. ELECTRON-MICROSCOPIC EVIDENCE FOR THE LOCALIZATION OF RIBONUCLEIC ACID IN THE PARTICLES OF TOBACCO MOSAIC VIRUS. Proc Natl Acad Sci U S A. 1955 May 15;41(5):261-4. doi: 10.1073/pnas.41.5.261.

HOLOUBEK V. Mixed reconstitution between protein from common tobacco mosaic virus and ribonucleic acid from other strains. Virology. 1962 Nov;18:401-4. doi: 10.1016/0042-6822(62)90030-2

Jeong RD, Choi HS. Inactivation of tobacco mosaic virus using gamma irradiation and its potential modes of action. Acta Virol. 2017;61(2):223-225. doi: 10.4149/av\_2017\_02\_14

Jones, R.A.C. , Koenig, R. and Lesemann, D.E. (1980) Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). Ann. Appl. Biol. 94, 61–68

Ivanovsky, D. 1903. On the mosaic disease of tobacco. Z. Pflanzenkr. Pflanzenpathol. Pflanzenschutz

Kausche, G.A., Pfankuch, E. & Ruska, H. Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. Naturwissenschaften 27, 292–299 (1939). <https://doi.org/10.1007/BF01493353>

Li L, Wang L, Xiao R, Zhu G, Li Y, Liu C, Yang R, Tang Z, Li J, Huang W, Chen L, Zheng X, He Y, Tan J. The invasion of tobacco mosaic virus RNA induces endoplasmic reticulum stress-related autophagy in HeLa cells. Biosci Rep. 2012 Apr 1;32(2):171-86. doi: 10.1042/BSR20110069

Li S, Wang D, Ghulam A, Li X, Li M, Li Q, Ma Y, Wang L, Wu H, Cui Z, Zhang XE. Tracking the Replication-Competent Zika Virus with Tetracysteine-Tagged Capsid Protein in Living Cells. *J Virol.* 2022 Apr 13;96(7):e0184621. doi: 10.1128/jvi.01846-21

Lojek JS, Orlob GB. Aphid transmission of tobacco mosaic virus. *Science.* 1969 Jun 20;164(3886):1407-8. doi: 10.1126/science.164.3886.

H. S. Loring, W.M. Stanley. ISOLATION OF CRYSTALLINE TOBACCO MOSAIC VIRUS PROTEIN FROM TOMATO PLANTS. *Journal of Biological Chemistry* 1937, 117 (2) , 733-754.

Mayer, Adolf (1886). "Über die Mosaikkrankheit des Tabaks". *Die Landwirtschaftliche Versuchs-stationen* (in German). 32: 451—467. Translated into English in Johnson, J., Ed. (1942) *Phytopathological classics* (St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society) No. 7, pp. 11—24.

Milne, R. G. (1966). Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. *Virology*, 28(1), 79–89. doi:10.1016/0042-6822(66)90308

Park, W. M., Lee, G. P., Ryu, K. H., & Park, K. W. (1999). Transmission of tobacco mosaic virus in recirculating hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 79(3-4), 217–226. doi:10.1016/s0304-4238(98)00215-5

Predmore A, Sanglay GC, DiCaprio E, Li J, Uribe RM, Lee K. Electron beam inactivation of Tulane virus on fresh produce, and mechanism of inactivation of human norovirus surrogates by electron beam irradiation. *Int J Food Microbiol.* 2015 Apr 2;198:28-36. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.024

Piazzolla, P., Castellano, M. A., & Stradis, A. (1986). Presence of Plant Viruses in some Rivers of Southern Italy. *Journal of Phytopathology*, 116(3), 244–246. doi:10.1111/j.1439-0434.1986.tb00917.x

Price, W. C. (1946). PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION OF SOUTHERN BEAN MOSAIC VIRUS. *American Journal of Botany*, 33(1), 45–54. doi:10.1002/j.1537-2197.1946.tb10

Purdy, H. A. (1929). IMMUNOLOGIC REACTIONS WITH TOBACCO MOSAIC VIRUS. *Journal of Experimental Medicine*, 49(6), 919–935. doi:10.1084/jem.49.6.919

RAPPAPORT I, SIEGEL A. Inactivation of tobacco mosaic virus by rabbit antiserum. *J Immunol.* 1955 Feb;74(2):106-16

RAPPAPORT I, WILDMAN SG, FURUMOTO W. INACTIVATION OF DUPONOL-TREATED TOBACCO MOSAIC VIRUS WITH RABBIT ANTISERUM. *Virology.* 1964 Jul;23:389-93. doi: 10.1016/0042-6822(64)90261-2

ROCHOW WF, BRAKKE MK. PURIFICATION OF BARLEY YELLOW DWARF VIRUS. *Virology*. 1964 Nov;24:310-22. doi: 10.1016/0042-6822(64)90169-2

Ruiz-Ramón F, Sempere RN, Méndez-López E, Sánchez-Pina MA, Aranda MA. Second generation of pepino mosaic virus vectors: improved stability in tomato and a wide range of reporter genes. *Plant Methods*. 2019 May 28;15:58. doi: 10.1186/s13007-019-0446-4

SAMUEL, G. (1931). Some Experiments On Inoculating Methods With Plant Viruses, And On Local Lesions. *Annals of Applied Biology*, 18(4), 494–507. doi:10.1111/j.1744-7348.1931.t

Sempere RN, Gómez P, Truniger V, Aranda MA. Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. *Plant Methods*. 2011 Mar 11;7:6. doi: 10.1186/1746-4811-7-6

SIEGEL, A., WILDMAN, S. G., & GINOZA, W. (1956). Sensitivity to Ultra-violet Light of Infectious Tobacco Mosaic Virus Nucleic Acid. *Nature*, 178(4542), 1117–1118. doi:10.1038/1781117a0

SCHRAMM, G., SCHUMACHER, G., & ZILLIG, W. (1955). *An Infectious Nucleoprotein from Tobacco Mosaic Virus*. *Nature*, 175(4456), 549–550. doi:10.1038/175549a0

Smith J.H. (1929) THE TRANSMISSION OF POTATO MOSAIC TO TOMATO. *Ann. Biol.* XV

Stanley WM. ISOLATION OF A CRYSTALLINE PROTEIN POSSESSING THE PROPERTIES OF TOBACCO-MOSAIC VIRUS. *Science*. **1935 - b** Jun 28;81(2113):644-5. doi: 10.1126/science.81.2113.644. PMID: 17743301.

STANLEY, W.A., Chemical studies on the virus of tobacco mosaic X. The activity and yield of virus protein from plants diseased for different periods of time, *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **121**: 205 (1937a).

Stanley, W. M. (1936). THE INACTIVATION OF CRYSTALLINE TOBACCO-MOSAIC VIRUS PROTEIN. *Science*, 83(2165), 626–627.

Stanley, W.M. 1940: Purification of tomato bushy stunt virus by differential centrifugation *Journal of Biological Chemistry* 135(2): 437-454

Steere, Russell L. "Virus Increment Curves Obtained from Counts of Particles in Clarified Plant Juice." *American Journal of Botany* 39, no. 3 (1952): 211–20. <https://doi.org/10.2307/2438360>.

STEERE RL. Tobacco mosaic virus: purifying and sorting associated particles according to length. *Science*. 1963 Jun 7;140(3571):1089-90. doi: 10.1126/science.140.3571.1089

Steere, R. L., & Williams, R. C. (1953). Identification of Crystalline Inclusion Bodies Extracted Intact from Plant Cells Infected with Tobacco Mosaic Virus. *American Journal of Botany*, 40(2), 81. doi:10.2307/2438849

Stussi C, Lebeurier G, Hirth L. Partial reconstitution of tobacco mosaic virus. *Virology*. 1969 May;38(1):16-25. doi: 10.1016/0042-6822(69)90123-8

Symington J, Commoner B, Yamada M. LINEAR BIOSYNTHESIS OF TOBACCO MOSAIC VIRUS: EVIDENCE THAT SHORT VIRUS RODS ARE NATURAL PRODUCTS OF TMV BIOSYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Sep;48(9):1675-83. doi: 10.1073/pnas.48.9.1675

TOMLINSON, J. A. (1964). Purification and properties of lettuce mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, 53(1), 95–102. doi:10.1111/j.1744-7348.1964.tb03

TOMLINSON, J. A., FAITHFULL, E. M., WEBB, M. J. W., FRASER, R. S. S., & SEELEY, N. D. (1983). Chenopodium necrosis: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. *Annals of Applied Biology*, 102(1), 135–147. doi:10.1111/j.1744-7348.1983.tb02674.x

Tošić, M., & Tošić, D. (1984). Occurrence of Tobacco Mosaic virus in Water Of the Danube and Sava Rivers. *Journal of Phytopathology*, 110(3), 200–202. doi:10.1111/j.1439-0434.1984.tb00748.x

Wan J, Cabanillas DG, Zheng H, Laliberté JF. Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol*. 2015 Apr;167(4):1374-88. doi: 10.1104/pp.15.00097

[REDACTED]

**Věc: oprava chybné citace a formulací v odpovědi ze dne 1.3.2023 ve věci existence viru mozaiky tabáku (TMV) a upozornění na zveřejnění podrobnějších informací**

Vážená paní [REDACTED],

v mojí odpovědi ze dne 1.3.2023 na váš dotaz ze dne 14.2.2023 jsem v části 4) jsem omylem přiřadil k textu o výskytu viru TMV v povrchových vodách dvě studie (Tošic a Tošic, 1984; Boben a kol., 2007). Tohoto viru se ale týkala pouze první ze zmiňovaných studií, druhá zkoumala jeho blízkého příbuzného ToMV (tomato mosaic virus) - jak je ostatně patrné z citace následující bezprostředně za zmiňovaným textem. Dále jsem v bodě 1.) omylem ponechal text "(citace)", který zde být nemá, a v bodě 1.) c) jsem nepřesně formuloval vysvětlení reakce séra.

Příslušné texty mají správně znít tak, jak je uvedeno v níže přiložené opravě (vyznačeno červeně), kterou vám tímto posílám a **omlouvám se za původní chybnou formulaci!**

Zároveň vás informuji, že **článek s podrobnějšími informacemi** o důkazech existence viru mozaiky tabáku, tak jak jsem **avizoval v původní odpovědi ze dne 1.3.2023**, jsme nyní zveřejnili na webových stránkách Biologického centra na adrese:

<https://www.bc.cas.cz/novinky/detail/6803-virus-mozaiky-tabaku-tmv-/>

Tento článek budu v budoucnu dále doplňovat o relevantní vědecké studie - ale věřím, že v něm už nyní najdete podrobnější a snad i lépe formulované vysvětlení vámi požadovaných důkazů existence (nejen) TMV a jeho vlastností.

Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.

V Českých Budějovicích dne 10.3.2023

## Oprava původního chybného textu (červeně):

### bod 1.)

- mezi prvními, kdo na přelomu 19. a 20. století objevil infekčnost mozaiky tabáku (schopnost choroby šířit se z nemocných rostlin na zdravé) byli Adolf Eduard Mayer (~~citace~~), Dmitri Iosifovich Ivanovskij (~~citace~~) a Martinus Willem Beijerinck (~~citace~~)

### bod 1.) část c)

- Tyto protilátky (sérum) se ale liší, část séra vytvořeného proti šťávě z nemocných rostlin nereaguje se šťávou ze ~~nemocných~~ ~~zdravých~~ rostlin - sérum proti nemocné rostlině tedy ~~obsahuje něco~~ ~~reaguje s něčím~~ "navíc", co není přítomno ve zdravých kytkách (Dvorak, 1927; Purdy, 1929, Beale, 1931).

### bod 4.)

- Infekce schopný virus TMV byl prokázán i v povrchových vodách (např. Tošić a Tošić, 1984). Jeho blízký příbuzný, virus ToMV, ~~Infekční virus~~ byl také izolován z povrchových vod, a po inokulaci na rostliny, i po zalévání rostlin touto vodou se v řadě případů objevily příznaky typické choroby ToMV ~~TMV~~, virus byl poté rostlině dokázán dalšími metodami jako ~~RT-PCR~~, real-time PCR, ELISA a elektronová mikroskopie (např. ~~Tošić a Tošić, 1984; nebo~~ Boben a kol., 2007)

"Plant tissue was analysed using quantitative ToMV-specific real-time PCR. The plants which had been watered with a diluted elution fraction tested ToMV-positive with an estimate concentration of  $4.0 \times 10^{-9}$  mg ml<sup>-1</sup>. The concentration of ToMV in plants watered with original irrigation water from the gravel pit in Ivanci was estimated to be at the limit of detection (LOD) for the method:  $4.2 \times 10^{-10}$  mg ml<sup>-1</sup>. The plants used as a control had Ct values below those corresponding to our LOD in the test." (Boben a kol., 2007)