

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Molekulární charakteristika
Little cherry virus 1
v genových zdrojích meruněk

Diplomová práce

Bc. Veronika Ševčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na molekulární charakteristiku *Little cherry virus 1* (LChV1), původce virového onemocnění Little cherry disease.

V teoretické části jsou nejprve uvedeny základní informace o čeledi *Closteroviridae*, rodu *Velarivirus*, do kterých je LChV1 taxonomicky zařazen, a také o viru samotném. Dále je teoretická část zaměřena na molekulární a genetickou charakteristiku LChV1, ve které jsou podrobně popsány jednotlivé čtecí rámce ORF. V práci jsou popsány biologické vlastnosti viru jako hostitelský okruh, příznaky, způsob přenosu a vliv infekce na výnos. LChV1 napadá pouze rostliny z rodu *Prunus*, na kterých je možné pozorovat typické příznaky jako zakrslost a tvarové a barevné změny na listech a plodech. Virus je celosvětově rozšířen, především v oblastech komerčního pěstování peckovin. Podrobnější geografické rozšíření LChV1 je popsáno v jedné z kapitol. Na závěr jsou popsány možné způsoby detekce viru a jeho genetická variabilita.

Experimentální část je zaměřena na získání celogenomických sekvencí vybraných izolátů LChV1, pocházejících z meruněk (*Prunus armeniaca*). Byly stanoveny téměř celogenomické sekvence pro izoláty Apr153, Apr156, Apr161 a Apr172. Současně byla potvrzena genetická variabilita LChV1.

SUMMARY

The diploma thesis is focused on the molecular characteristics *Little cherry virus 1* (LChV1), the causer of viral disease Little cherry disease.

In the theoretical part, the basic information about the family *Closteroviridae*, genus *Velarivirus*, into which LChV1 is taxonomically included, and the virus itself are mentioned at first. Further, the theoretical part is focused on the molecular and genetic characteristics of LChV1, in which individual ORF reading frames are described in detail. In the thesis the biological characteristics are described, like the host range, symptoms, the mode of transmission and the effect of the infection on the yield. LChV1 infects only plants of the genus *Prunus*, on which typical symptoms such as dwarfism and shape and color changes on leaves and fruits can be observed. The virus is distributed worldwide, especially in areas involving the commercial cultivation of stone fruits. The more detailed geographical distribution of LChV1 is described in one of the chapters. In the end, possible ways of detection of the virus and its genetic variability are described.

The experimental part is focused on the obtaining fullgenomic sequences of chosen isolates LChV1, originated from apricots (*Prunus armeniaca*). Almost complete fullgenomic sequences of isolates Apr153, Apr156, Apr161 and Apr172 were determined. At the same time, the genetic variability of LChV1 was confirmed.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení, podnětné připomínky a množství času, které mi věnoval během vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům z Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, kteří mi pomáhali při mé práci v laboratoři. Moje poděkování patří také rodině a přátelům, kteří mi byli velkou psychickou i morální podporou.

Práce byly financovány Interní grantovou agenturou Univerzity Palackého (IGA_PrF_2017_04, IGA_PrF_2018_05).

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	2
3	ČELEĎ <i>CLOSTEROVIRIDAE</i>	3
4	ROD <i>VELARIVIRUS</i>	3
5	<i>LITTLE CHERRY VIRUS 1</i>	4
5.1	Molekulární a genetická charakteristika LChV1	4
5.2	Biologické vlastnosti LChV1	6
5.2.1	Hostitelský okruh.....	6
5.2.2	Příznaky vyvolané virem	7
5.2.3	Způsob přenosu	7
5.2.4	Ovlivnění výnosu po infekci.....	8
5.3	Geografické rozšíření LChV1	8
5.4	Detekce a diagnostika LChV1	10
5.5	Genetická variabilita	11
6	MATERIÁL A METODY	12
6.1	Biologický materiál.....	12
6.2	NGS sekvenování	12
6.3	Izolace RNA	13
6.4	RT-PCR	13
6.5	Elektroforetická separace.....	16
6.6	Izolace PCR produktu z gelu	16
6.7	Klonování PCR produktů.....	16
6.8	Sangerovo sekvencování.....	17
6.9	Bioinformatická analýza	18
6.10	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
6.10.1	Použité chemikálie.....	19

6.10.2	Použité soupravy	19
6.10.3	Použité roztoky a jejich příprava	19
6.11	Použité přístroje	20
7	VÝSLEDKY	21
8	DISKUZE.....	33
9	ZÁVĚR.....	36
10	SEZNAM VYUŽITÉ LITERATURY	37

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Schématické zobrazení struktury genomu <i>Little cherry virus 1</i>	5
Obrázek č. 2: Virová částice <i>Little cherry virus 1</i> , zachyceno pomocí imunoelektronové mikroskopie	6
Obrázek č. 3: Mapa geografického rozšíření <i>Little cherry virus 1</i>	9
Obrázek č. 4: Všechny sady primerů použité pro PCR amplifikaci izolátů LChV1	15
Obrázek č. 5: Příklad detekce LChV1 pomocí RT-PCR amplifikace, použity primery LChV1_14, LChV1_15 a LChV1_16	22
Obrázek č. 6: Fylogenetický strom izolátů LChV1	28
Obrázek č. 7: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - RdRp	29
Obrázek č. 8: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - HSP70h	30
Obrázek č. 9: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - CP.....	31

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Seznam použitých izolátů LChV1 původem z meruněk (<i>P. armeniaca</i>).....	12
Tabulka č. 2: Sekvence primerů použitých pro detekci LChV1.....	14
Tabulka č. 3: Sekvence primerů pro získání a ověření celogenomových sekvencí LChV1	14
Tabulka č. 4: Data získaná NGS sekvenováním na platformě MiSeq a analýzou v programu Geneious	21
Tabulka č. 5: Očekávané a získané velikosti PCR produktů LChV1 izolátů Apr153, Apr156, Apr161, Apr172	23
Tabulka č. 6: Stanovení variability mezi vybranými PCR produkty, zastupujícími jednotlivé genomické segmenty.....	24

1 ÚVOD

Peckoviny jsou významnou skupinou ovocných dřevin a jejich pěstování má důležitou roli v zemědělství mnoha zemí mírného a subtropického pásma. Mezi nejvýznamnější ovocné druhy této skupiny patří třešeň (*Prunus avium*), višně (*Prunus cerasus*), slivoň (*Prunus domestica*), broskvoň (*Prunus persica*) a meruňka (*Prunus armeniaca*). Třešně a višně jsou hned po jabloních druhé nejvíce zastoupené ovocné druhy, co se týká pěstování v České republice. Virová onemocnění peckovin způsobují velké škody v ovocných sadech, což má za následek velký pokles výnosu. Viry mohou být v infikovaných stromech přítomny samostatně nebo v kombinaci s několika dalšími viry. Pěstování a vysazování zdravého množitelského materiálu je nejčastějším způsobem ochrany peckovin proti virovým chorobám. Dalším způsobem je také pěstování rezistentních odrůd nebo kontrola hmyzích vektorů.

Nejznámější, ale také nejzávažnější, chorobou u peckovin je šarka švestky, způsobená virem šarky švestky (*Plum pox virus*). Mezi další velmi rozšířené druhy infikující peckoviny patří *Prune dwarf virus* a *Prunus necrotic ring spot virus*. Dále byl u peckoviny popsán výskyt *Apple mosaic virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Cherry leaf roll virus*, *Little cherry virus 1* a *Little cherry virus 2*.

Tato diplomová práce je zaměřena na popsání *Little cherry virus 1*, jeho taxonomického zařazení, molekulárních a biologických vlastností, výskytu, možností detekce a genetické variability. Cílem experimentální části je získání parciálních sekvencí LChV1 u testovaných meruňkových izolátů a jejich následně spojení do celogenomických sekvencí. U sestavených sekvencí byla zjišťována genetická variabilita viru, jak na úrovni celého genomu, tak na úrovni čtecích rámců kódujících RNA dependentní RNA polymerázu, HSP70h-like protein a hlavní plášťový protein.

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma „Genetická variabilita *Little cherry virus 1*“.
- Detekce a identifikace viru ve vzorcích.
- Sestavení celogenomických sekvencí vybraných izolátů *Little cherry virus 1*.
- Stanovení genetické variability izolátů *Little cherry virus 1* a sekvencí dostupných v NCBI databázi.

3 ČELEĎ *CLOSTEROVIRIDAE*

Čeď *Closteroviridae* je jednou z nejpočetnějších čeledí rostlinných virů. Tato čeď byla ustanovena v roce 1996 na virologickém kongresu ICTV, který se konal v Jeruzalémě. Současně byl do této nové čeledi zařazen rod *Closterovirus*, který byl dříve součástí čeledi *Tombusviridae*. Celkově tato čeď zahrnuje 43 virových druhů, rozdělených do rodů *Closterovirus*, *Velarivirus*, *Ampelovirus* a *Crinivirus*, a také 6 dosud nezařazených druhů. Jedná se o skupinu virů s jedinou lineární pozitivně orientovanou molekulou ssRNA, která tvoří cca 6% hmotnosti částice. Viriony jsou vláknité, flexibilní o délce 650-2000 nm a průměru 10-13 nm. Zástupci čeledi *Closteroviridae* mají jedny z největších genomů mezi rostlinnými viry, a to díky duplikacím a výskytu nevirových kódujících sekvencí (Pringle, 1996; ICTV, 2011; Martelli a kol., 2011; ICTV, 2016).

4 ROD *VELARIVIRUS*

Vyčlenění rodu *Velarivirus* jako samostatného rodu v rámci čeledi *Closteroviridae* bylo navrženo v roce 2012 a ratifikováno ICTV v roce 2014. Tento nový rod byl ustanoven na základě odlišnosti *Grapevine leaf roll-associated virus 7* (GLRaV-7) od zástupců rodů *Closterovirus*, *Ampelovirus* a *Crinivirus*. Mezi prvními zařazenými druhy, kromě GLRaV-7 (typový zástupce), byly *Little cherry virus 1* a *Cordyline virus 1*. Tyto druhy byly do té doby uváděny v rámci čeledi *Closteroviridae* jako nezařazené druhy. Do současné doby byly do rodu zařazeny také druhy *Areca palm velarivirus 1*, *Cordyline virus 2*, *Cordyline virus 3* a *Cordyline virus 4* (ICTV, 2012; Martelli a kol., 2012; ICTV, 2016).

5 *LITTLE CHERRY VIRUS 1*

Little cherry disease (LChD) je virové onemocnění třešní a višní, které má významný dopad na výnos a kvalitu plodů. Poprvé bylo LChD pozorováno na třešních v roce 1933 v Kanadě, a následně popsáno v roce 1947. V té době se však jednalo pouze o popis příznaků choroby, nikoli o popis původce onemocnění (Foster a Lott, 1947, cit. podle Jelkmann a Eastwell, 2011; Németh, 1986). Za původce onemocnění jsou považovány dva viry z čeledi *Closteroviridae*, a to *Little cherry virus 1* z rodu *Velarivirus* a *Little cherry virus 2* z rodu *Ampelovirus*. Na konci minulého století nebyly tyto dva viry rozlišovány a byl pro ně používán souhrnný název *Little cherry virus*. Až v roce 2002 došlo k jejich odlišení na již uvedené druhy LChV1 a LChV2. Tito dva původci LChD se liší velikostí genomu a svými biologickými vlastnostmi, jako například způsobem přenosu (Wilks a Welsh, 1961; Németh, 1986; Jelkmann a Eastwell, 2011). Na začátku 21. století se objevily zmínky o existenci LChV3, později byl však tento izolát LC5 zařazen mezi izoláty LChV2 (Theilmann a kol., 2002; Theilmann a kol., 2004; Jelkmann a Eastwell, 2011).

Little cherry virus 1 byl v minulosti uváděn v literatuře pod různými názvy, jako např. *Cherry little cherry virus* nebo *Little cherry disease virus*. Jako další názvy lze uvést ještě *Cherry K* (Kwanzan) a *S* (Shirofugen) virus (Németh, 1986; Jelkmann a Eastwell, 2011).

Little cherry virus 1 ovšem není pouze původcem *Little cherry disease*, ale je spojován také se dvěma dalšími onemocněními a to *Shirofugen stunt disease* nebo „*Kwanzan stunting*“ syndrom (Németh, 1986; Matic a kol., 2009; Candresse a kol., 2013).

5.1 Molekulární a genetická charakteristika LChV1

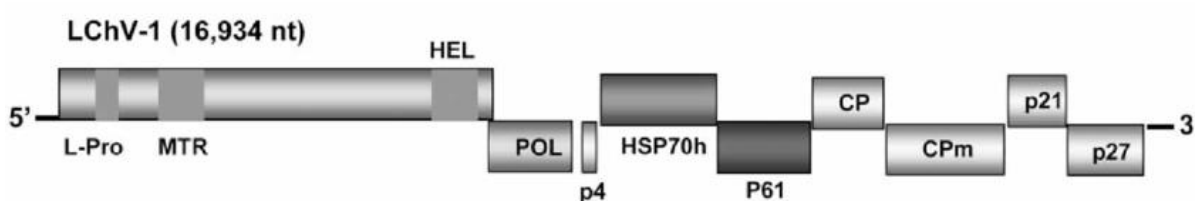
V současné době jsou známy celogenomické sekvence u 8 izolátů LChV1: třešňové izoláty Jerte (Acc. No. KX192366), Ponferrada (Acc. No. KX192367), UW2 (Acc. No. Y10237), Taian (Acc. No. KR736335) a G15 3 (Acc. No. LN794218), višňové izoláty V2356 (Acc. No. JX669615) a ITMAR (Acc. No. EU715989) a broskvoňový izolát YD (Acc. No. KR080325).

První celogenomická sekvence *Little cherry virus 1* byla stanovena v roce 1997 u německého izolátu, pocházejícího z třešně. Genom tohoto referenčního izolátu UW2 (Acc. No. NC_001836/ Acc. No. Y10237) má 16 934 nt. Na 5' konci se nachází methylguanozinová čepička a 3' konec není polyadenylován. Podle Vitushkina a kol. (1997) sekvence na 3' konci vykazují vyšší míru podobnosti, i když nejsou zcela identické. Koncové oblasti genomu,

tzv. 5' a 3' nepřekládané koncové oblasti mají délku 75 nt a 206 nt. Na genomu LChV1 se nachází celkem devět otevřených čtecích rámců (viz Obrázek č. 1) (Jelkmann a kol., 1997; Wang a kol., 2016).

Komplex ORF1a - ORF1b kóduje proteiny spojené s virovou replikací. První čtecí rámec ORF1a se nachází na pozici 77 - 6 982 nt a kóduje 260 kDa velký polyprotein. Součástí tohoto polyproteinu jsou tři významné domény zahrnující papain-like proteázu, methyltransferázu a helikázu. Pro viry z čeledi *Closteroviridae* je typická variabilní oblast mezi methyltransferázovou a helikázovou doménou (Jelkmann a kol., 1997; Erokhina a kol., 2000; Dolja a kol., 2006). Čtecí rámec ORF1b (pozice 6 951 - 8 498 nt) kóduje RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp). Translace čtecího rámce ORF1b je iniciována pomocí 1+ ribozomálního posunu stop kodonu ORF1a (GUU-UGA-C). Čtecí rámec ORF2 (8 503 - 8 613 nt) kóduje malý hydrofobní protein s transmembránovou doménou, která pravděpodobně hraje roli při vnitrobuněčném pohybu. Protein HSP70h-like je kódován čtecím rámcem ORF3 (8 603 - 10 459 nt). V této doméně se často vyskytuje jednonukleotidová inserce, která má za následek předčasné ukončení translace a produkci kratšího HSP70h proteinu. ORF4 (10 431 - 11 984 nt) kóduje polypeptid o velikosti 61 kDa. Čtecí rámec ORF5 (12 064 - 13 278 nt) kóduje hlavní plášťový protein. Putativní plášťový protein je pak kódován čtecím rámcem ORF6 (13 284 - 15 278 nt). Čtecí rámce ORF7 (15 426 - 15 971 nt) a ORF8 (16 008 - 16 727 nt) nesou geny pro dva hypotetické proteiny, u kterých zatím není známá funkce (Jelkmann a kol., 1997; Dolja a kol., 2006; Wang a kol., 2016).

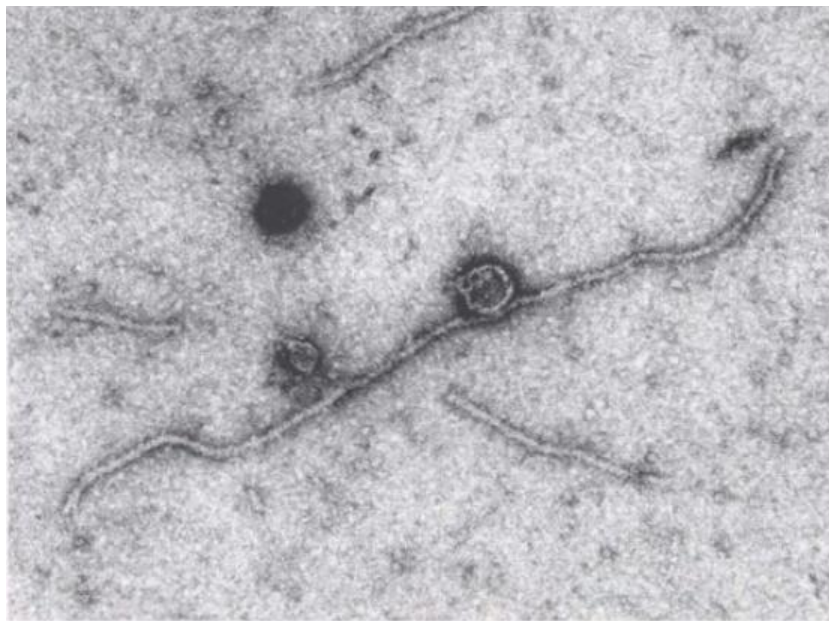
Obrázek č. 1: Schématické zobrazení struktury genomu *Little cherry virus 1* (převzato z Martelli a kol., 2012)



L-Pro - papain-like proteáza; MTR - methyltransferáza; HEL - helikáza; POL - RNA dependentní RNA polymeráza; p4 - hydrofobní protein, 4 kDa; HSP70h - HSP70h- like protein; P61 -protein, 61 kDa; CP - plášťový protein, CPm - putativní plášťový protein; p21 - hypotetický protein; p27 - hypotetický protein

Virové částice LChV1 mají podobu dlouhých zakřivených tyček, o rozměrech 1 786 - 1 820 nm (viz Obrázek č. 2) (Jelkmann a Eastwell, 2011).

Obrázek č. 2: Virová částice *Little cherry virus 1*, zachyceno pomocí imunoelektronové mikroskopie (převzato z Jelkmann a Eastwell, 2011)



5.2 Biologické vlastnosti LChV1

5.2.1 Hostitelský okruh

Little cherry virus 1 byl poprvé detekován a popsán v roce 1997 v Německu na třešních (*Prunus avium*). Nalezen byl ale také na višních (*P. cerasus*) a orientálních kvetoucích třešních *P. serrulata*. Výše zmíněné druhy slivoní spolu s *P. insica*, *P. pensylvanica*, *P. fontanesiana*, *P. sieboldii*, *P. subhirtella*, *P. yedoensis* a *P. emarginata* byly dříve považovány za jediné hostitele LChV1. Naopak broskvoně (*P. persica*), mandloně (*P. amygdalus*), meruňky (*P. armeniaca*), švestky domácí (*P. domestica*) a *P. virginiana* nebyly považovány za přirozené hostitele, na které by bylo možné virus přenést (Wilks a Welsh, 1961; Németh, 1986; Jelkmann a kol., 1997; Vitushkina a kol., 1997).

Dnes je již ověřeno, že kromě třešní a višní, kteří jsou hlavní hostitelé, napadá tento virus také již zmíněné slivoně, broskvoně, meruňky a mandloně (Matic a kol., 2007; Šafářová a kol., 2017). Jako další hostitele je možné jmenovat ještě *P. salicina*, *P. mahaleb*, *P. tomentosa* a *P. maackii*. Obecně platí, že okruh hostitelů LChV1 je omezen pouze na zástupce rodu *Prunus*. Podle dostupných údajů není hostitelský okruh nijak ovlivněn geografickým rozšířením (Wang a kol., 2016; Németh, 1986; Jelkmann a Eastwell, 2011; Marais a kol., 2016; Jeger a kol., 2017).

5.2.2 Příznaky vyvolané virem

Klasickým příznakem, který vyvolává *Little cherry virus 1*, je menší vzrůst až zakrslost celé rostliny. Jako typické příznaky u plodů infikovaných stromů se uvádí jejich abnormální tvar a velikost, nevýrazná chuť, slabé zbarvení a nízký obsah cukru. Plody z napadených stromů bývají o 25-60 % menší než plody zdravých stromů. U listů je pak možné sledovat různé tvarové a barevné změny. Často bývá uváděno červenofialové nebo bronzové zbarvení povrchu listu, přičemž žilnatina zůstává zelená. Kultivary s tmavě červenými plody bývají závažněji poškozeny než druhy se světlými plody (Németh, 1986; Serçe a kol., 2010; Jelkmann a Eastwell, 2011; Jeger a kol., 2017).

Tyto příznaky bývají pozorovány pouze u senzitivních druhů, jako jsou třešně a višně, zatímco u jiných druhů se virová infekce neprojevuje tak výraznými příznaky. V některých případech může infekce probíhat i zcela bezpříznakově. Kultivary stejného druhu mohou reagovat na infekci různými příznaky, které se mohou lišit i v závislosti na lokalitě. Intenzitu příznaků mohou ovlivňovat i jiné faktory, jako např. klimatické prostředí nebo vegetačního období (Németh, 1986; Jelkmann a Eastwell, 2011; Jeger a kol., 2017)

5.2.3 Způsob přenosu

Jedinou známou možností jak přenést *Little cherry virus 1* je vegetativní cestou, tj. roubováním nebo očkováním, kdy zdrojem je infikovaný rostlinný materiál. Přenos LChV1 pylem, semeny nebo vektory nebyl potvrzen. Velmi významnou cestou šíření viru je dovoz infikovaných rostlin z rodu *Prunus* pro výsadbu, především z neevropských zemí (Jelkmann a Eastwell, 2011; Tahzima a kol., 2017; Jeger a kol., 2017).

V roce 2010 byl testován možný mechanický přenos viru na rostliny *Nicotiana occidentalis*, tyto pokusy byly neúspěšné. Ve stejném roce se experimentálně podařilo přenést virus pomocí kokotice evropské (*Cuscuta europea*). Jednalo se o druhý úspěšný pokus o přenesení viru z čeledi *Closteroviridae* na rostlinu bylinného typu pomocí parazitické rostliny. Poprvé byl takto v roce 2010 přenesen *Grapevine leafroll-associated virus-7* pomocí *C. reflexa* a *C. europea*. Přenos pomocí kokotice byl popsán již dříve u jiných virů z čeledi *Closteroviridae*, nicméně při těchto pokusech byl jako akceptorová rostlina použit přirozený hostitel (Jelkmann a kol., 2010; Mikona a Jelkmann, 2010).

5.2.4 Ovlivnění výnosu po infekci

Little cherry disease výrazně snižuje kvalitu plodů třešňí a višňí a dochází k významnému pokles výnosu. Ovlivnění výnosu bývá popisováno pouze pro LChD, proto nelze přesně určit, jaký podíl má LChV1. Velmi rozsáhlý dopad LChD na komerční produkci ovoce byl historicky zdokumentován v oblastech Britské Kolumbie v Kanadě, kde došlo ke zničení velké části průmyslu zaměřeného na produkci třešňí. Podle dostupných informací zde mezi roky 1947 až 1979 klesla produkce třešňí o 90 %, z 680 000 kg třešňí na 68 000 kg. Další hospodářsky významný pokles výnosu u třešňí byl zaznamenán také v západních státech USA. Na začátku 90. let 20. století byl výskyt LChD zaznamenán v severním Německu (Bajet a kol., 2008; Jelkmann a Eastwell, 2011; Jeger a kol., 2017).

V dnešní době je produkce školkařských materiálů, především třešňí a višňí, přísně kontrolována na přítomnost LChD, aby se zabránilo šíření viru. Evropská a středozevní organizace ochrany rostlin (EPPO) vydává přesné směrnice a certifikační schémata pro množení a pěstování rizikových ovocných stromů. Certifikované rostliny jsou množeny v kontrolovaném prostředí a testovány na nepřítomnost škodlivých organismů (EPPO, 2001; Jelkmann a Eastwell, 2011; Ludvíková a Suchá, 2011; Jeger a kol., 2017).

5.3 Geografické rozšíření LChV1

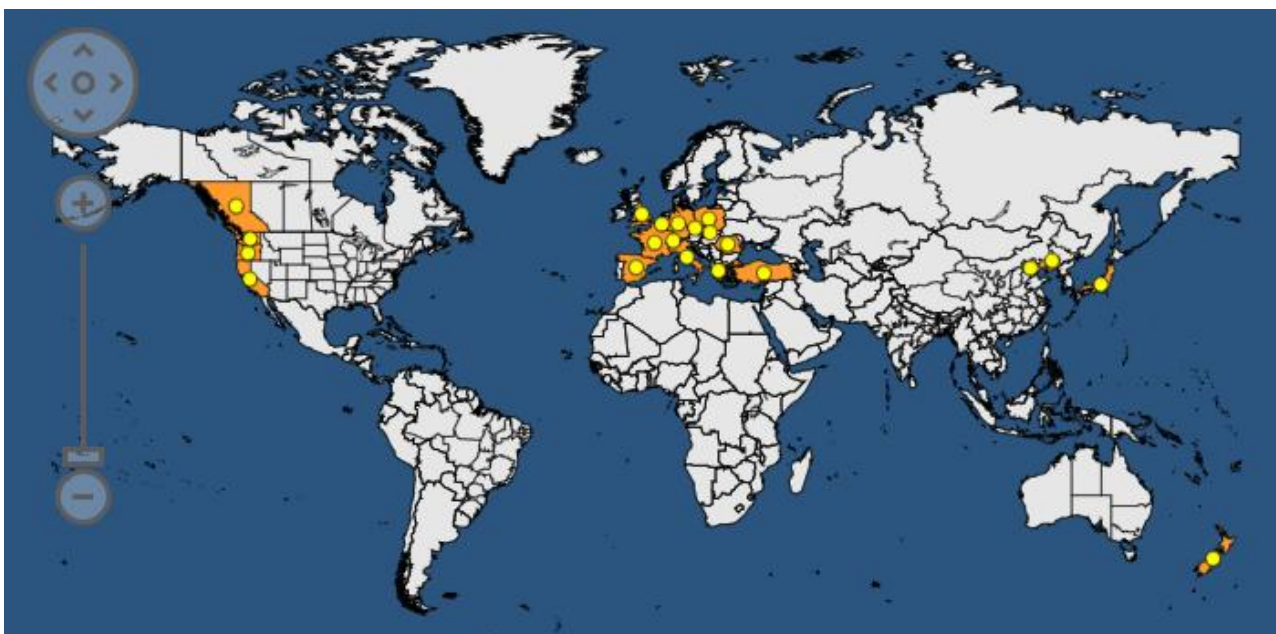
Little cherry virus 1 se vyskytuje téměř celosvětově (viz Obrázek č. 3). Jeho rozšíření však může být ještě rozsáhlejší, než je doposud známo, a to především z důvodu bezpříznakových infekcí. Teoreticky by mohl být virus nalezen ve většině oblastí, kde jsou pěstovány třešně, višně a okrasné druhy rodu *Prunus* (Jelkmann a Eastwell, 2011; Jeger a kol., 2017).

V Evropě je virus velmi rozšířen, byl detekován např. v Belgii, Německu, Polsku, Rumunsku, Řecku, Švýcarsku, Turecku a Velké Británii (Tahzima a kol., 2017; Németh, 1986; Serçe a kol., 2010; Elena a kol., 2008; Komorowska a Cieślińska, 2004). Na Slovensku byla potvrzena dlouhodobá přítomnost tohoto viru u krajových druhů třešňí (Glasa a kol., 2015). V České republice je výskyt LChD pozorován zhruba od roku 2007, přítomnost LChV1 však byla potvrzena až v roce 2011. Přítomnost viru v České republice začala být testována v důsledku objevení LChD v Německu a Polsku (Ludvíková a Suchá, 2011). Ve Španělsku byl virus poprvé detekován v roce 2016 u třešňí (Ruiz-Garcia a kol., 2016). V letech 2004 až 2016 probíhalo ve Francii testování rostlin

z rodu *Prunus*, při kterém byl potvrzen výskyt LChV1 a zároveň byl zjištěn vysoký výskyt LChV1 u *P. domestica* (Marais a kol., 2016). Výskyt v Itálii byl potvrzen v roce 2007 u třešní, zároveň byl poprvé zaznamenán výskyt LChV1 u slivoní, broskvoní a mandloní (Matic a kol., 2007).

Výskyt LChV1 byl potvrzen také na jiných kontinentech. V Japonsku byl výskyt viru, který způsobuje LChD, pozorován již v roce 1966. Další záznamy, tentokrát už o výskytu LChV1, pocházejí z roku 2004 (Tanaka a Hirose, 1966; Isogai a kol., 2004). V Číně byl LChV1 detekován poprvé u třešní v roce 2015 (Lu a kol., 2015). V roce 2008 byl v USA potvrzen výskyt LChV1 i LChV2, a to ve státech Washington, Kalifornie a Pensylvánie, jakožto hlavních amerických státech, zaměřených na produkci třešní (Bajet a kol., 2008). První záznam o přítomnosti LChV1 na území Jižní Koreje pochází z roku 2015 (Lim a kol., 2015). První výskyt LChV1 v Jižní Americe byl potvrzen u třešní v Chile v roce 2018 (Fiore a kol., 2018). Přítomnost viru byla prokázána také v Kanadě, Indii i na Novém Zélandu (Fry a Wood, 1970; Németh, 1986; Nagar a kol., 2009, cit. podle Jeger a kol., 2017).

Obrázek č. 3: Mapa geografického rozšíření *Little cherry virus 1* (převzato z <https://gd.eppo.int/taxon/LCHV10/distribution>)



5.4 Detekce a diagnostika LChV1

Little cherry virus 1 se v rostlinách objevuje buď samostatně ale také jako součást směsných infekcí. Nejčastějším a nejjednodušším způsobem detekce je klasická nebo real time PCR. Tato metoda je velmi upřednostňována a je velmi důležitá z toho hlediska, že LChV1 se v hostitelských rostlinách vyskytuje ve velmi nízké koncentraci, a proto je těžší ho detekovat jinými, méně citlivými, metodami. Z hlediska vysoké variability je ovšem potřeba správně navrhovat kombinace primerů, aby se předešlo falešně pozitivním a falešně negativním výsledkům (Vitushkina a kol., 1997; EPPO, 2001; Bajet a kol., 2008; Jelkmann a Eastwell, 2011). Z tohoto důvodu byly Jelkmannem a kol. (2008) navrženy primery na konzervativní oblasti plášťového proteinu, HSP70 proteinu a RNA-dependentní RNA polymerázy. Přesto v některých případech detekce pomocí těchto primerů selhávala. Proto Katsiani a kol. (2017) zdokonalili real-time PCR pro detekci a kvantifikaci LChV1, při které navrhli primery na konzervovanou oblast 3' konce CP genu. V roce 2015 Katsiani a kol. použili pro detekci LChV1 také nested-PCR, se zaměřením na 5' konec genu kódujícího HSP70h protein. LChV1 byl detekován také pomocí multiplex RT-PCR, spolu s dalšími viry napadajícími peckoviny (*Little cherry virus 2*, *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus*, *Cherry virus A*, *Cherry necrotic rusty mottle virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*) (Bajet a kol., 2008; Matic a kol., 2010; Noorani a kol., 2013).

Dalším možným způsobem testování je přenos na citlivé indikátorové rostliny. Biologické testy na bylinných nebo dřevinných indikátorech jsou standardní technikou u certifikačních programů pro odhalení latentních infekcí u rozmnožovacího materiálu. Jako indikátorové rostliny se velmi často používají citlivé kultivary třešní, jako např. 'Sam' nebo 'Canindex 1'. Důvodem jejich použití je fakt, že na listech těchto odrůd jsou spolehlivě viditelné příznaky napadení virem. Jako bylinné indikátory je možné použít i rostliny *Nicotiana occidentalis* „37B“, které reagují na infekci zkrácením listů a zarudnutím okrajů listů. Doba biologických testů na dřevinných indikátorech se v polních podmínkách pohybuje okolo jednoho roku, v některých případech se může prodloužit až na 2 roky. V regulovaném prostředí skleníku trvá testování na rostlinách 2-3 měsíce (Fridlund, 1980; EPPO, 2001; Jelkmann a kol., 2010; Jelkmann a Eastwell, 2011).

5.5 Genetická variabilita

Molekulární diverzita LChV1 je vysoká, stejně jako je tomu u dalších zástupců čeledi *Closteroviridae*. Mezi současná kritéria pro molekulární odlišení virových druhů z čeledi *Closteroviridae* patří především alespoň 25% rozdílnost v aminokyselinové sekvenci u genových produktů, kterými jsou RdRp, plášťový protein a HSP70h protein (Bajet a kol., 2008; Jelkmann a kol., 2008; Martelli a kol., 2011; Jeger a kol., 2017).

Genetická variabilita na úrovni nukleotidů se mezi izoláty LChV1 pohybuje v rozmezí 20-25 %. Prozatím ale nebyla zkoumána podrobněji. Předěšlé studie se zaměřily pouze na krátké fragmenty RNA dependentní RNA polymerázy, plášťového proteinu a 3' konce ORF8. Zároveň byly tyto sekvence, spolu se sekvencí genu pro HSP70h protein, nejčastěji použity pro stanovení fylogenetické příbuznosti. Podle dostupných studií nebyla nalezena korelace mezi fylogenetickou pozicí izolátů a jejich geografickým výskytem nebo hostitelským původem. Proto se usuzuje, že evoluční model LChV1 není založen na geografickém výskytu, ale je výrazně ovlivněn mezinárodním pohybem infikovaných materiálů (Katsiani a kol., 2015; Jeger a kol., 2017).

Katsiani a kol. (2015) se domnívají, že rekombinace s vysokou pravděpodobností hraje významnou roli v mikroevoluci LChV1. Tento svůj závěr opírají o dřívější molekulárně genetické analýzy, které naznačily časté homologní rekombinace mezi různými izoláty virů z čeledi *Closteroviridae* (Karasev, 2000; Farooq a kol., 2013; Rubio a kol., 2013).

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Biologický materiál

Z genové banky teplomilných peckovin, udržované v rámci Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně, byly vybrány 4 stromy meruněk (*P. armeniaca*), pozitivní na LChV1. Tyto vzorky byly odebrány ve výsadbě Zahradnické fakulty v Lednici v roce 2017. V Tabulce č. 1 je uveden seznam vzorků.

Tabulka č. 1: Seznam použitých izolátů LChV1 původem z meruněk (*P. armeniaca*)

Označení vzorku	Označení kultivaru, lokalizace stromu
Apr153	<i>VP-LE-12/6.3</i>
Apr156	<i>MAGIAR KAJSZII.1</i>
Apr161	<i>MAĎARSKÁ C235.1</i>
Apr172	<i>MARLEN.2</i>

6.2 NGS sekvenování

Pro NGS sekvenování byly vybrány izoláty Apr156, Apr161 a Apr172. Ze vzorků listů byla izolována siRNA pomocí Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen). Knihovny siRNA byly připraveny za použití TrueSeq Small RNA library preparation kit (Illumina) a sekvenovány na platformě MiSeq, za použití MiSeq v2 kitu (Illumina). Izolace siRNA, příprava knihovny a NGS sekvenování na platformě MiSeq byla provedena pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů (PřF UP Olomouc).

Výstupy z NGS sekvenování byly analyzovány pomocí programu Geneious 9.1.8, kdy sekvence byly mapovány na referenční sekvenci UW2. Pro analýzu byly použity následující podmínky: opakování 5x, 'minimum mapping quality' 30, 'minimum overlap' 20, 'minimum overlap identity' 90 %, 'word length' 15, 'index word length' 12, 'maximum mismatches per read' 10, 'maximum ambiguitiy' 4. 'Ready' byly filtrovány na velikost 15-35 nt.

6.3 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována pro ověření a doplnění mezer z NGS sekvenování pomocí Sangerova sekvenování. U izolátu Apr153, který nebyl použit pro NGS sekvenování, byla RNA izolována pro získání celogenomické sekvence. Izolace RNA byla provedena pomocí Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen) dle návodu od výrobce, s modifikací v druhém kroku při přípravě lyzátu, kdy ke zhomogenizovanému rostlinnému materiálu bylo místo doporučených 600 μ l přidáno 1,2 ml lyzačního pufru C.

6.4 RT-PCR

Po izolaci byla provedena reverzní transkripce pomocí MMLV transkriptázy BioScript (Bioline). Nejprve byla do 1,5ml mikrozkmavky připravena reakční směs I ve složení: 3,6 μ l DEPC H₂O, 1 μ l dNTPs (10 mM), 0,4 μ l random primeru. K této směsi bylo přidáno vždy 5 μ l RNA jednotlivých vzorků. Zkumavky byly vloženy do termocykleru, kde reakce běžela 5 min při 70 °C. Zkumavky byly poté inkubovány po dobu 2 min na ledu. Mezitím byla připravena reakční směs II ve složení: 4 μ l DEPC H₂O, 4 μ l RT pufr (5x), 1 μ l RNAsin a 1 μ l BioScript RT pol, která byla přidána do jednotlivých zkumavek s reakční směsí I. PCR zkumavky byly opět vloženy do termocykleru, kde reakce probíhala za podmínek: 10 min při 25 °C a 30 min při 42 °C.

PCR amplifikace byla provedena pomocí kitu MyTaq Red DNA Polymerase (Bioline). Do mikrozkmavky byla připravena reakční směs s následujícím složením: 4 μ l pufr (5x), 12,4 μ l H₂O, 0,2 μ l F primer (20 pmol/ μ l), 0,2 μ l R primer (20 pmol/ μ l) a 0,2 μ l Taq polymerázy (5U/ μ l). PCR reakce proběhla v termocykleru za podmínek: počáteční denaturace 3 min, 94 °C; denaturace 30 s při 94 °C, hybridizace primerů 30 s při 55 °C, prodlužování primerů 1 min při 72 °C; 35 cyklů; konečné prodlužování 7 min při 72 °C.

Pro detekci LChV1 byly použity nejprve primery LCV1U16390/ LCV1L16809 převzaté z článku Rott a Jelkmann (2001) a 1LC_12776F/1LC_13223R z článku Glasa a kol. (2015) (viz Tabulka č. 2). Následně, pro ověření výsledků NGS sekvenování, byly navrženy nové kombinace sekvenčních primerů pomocí programu Primer-BLAST (NCBI) (viz Tabulka č. 3). Pro jejich navržení sloužila jako templát téměř celogenomická sekvence izolátu Apr161 (*MAĎARSKÁ C235.1*), která byla získána NGS sekvenováním. Všechny sady primerů použité v rámci experimentální části jsou znázorněny v Obrázku č. 4.

Tabulka č. 2: Sekvence primerů použitých pro detekci LChV1

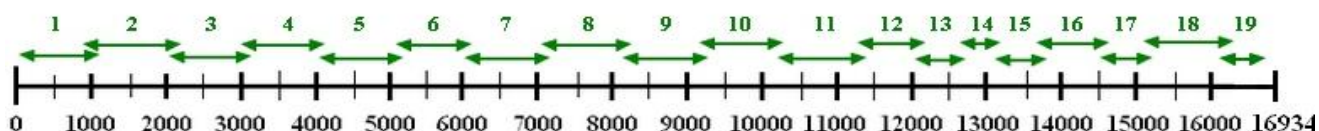
Označení	Sekvence (5'--- 3')	'Annealing' teplota (°C)	Velikost produktu (nt)
LCV1U16390	TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA	55	420
LCV1L16809	GGTAAGCGGTATAAAAACCCTCCTCT		
1LC_12776F	TCAAGAAAAGTTCTGGTGTGC	53	448
1LC_13223R	CGAGCTAGACGTATCAGTATC3		

Tabulka č. 3: Sekvence primerů pro získání a ověření celogenomických sekvencí LChV1

Číslo sady	Označení	Sekvence (5'--- 3')	Velikost produktu (nt)	Pozice produktu
1	LChV1_F1seq	TTTATCTCCCAGCTTTGTGCCT	1089	6-1094
	LChV1_R1seq	AAGCGTACGTCCGGAGTTG		
2	LChV1_F2seq	CACAACACTCGTCCTTTTGAGG	1286	945-2230
	LChV1_R2seq	ACAACATTGAAAACCTGGGTGACT		
3	LChV1_F3seq	TTGAACCGTGTAGGTTGTGC	1093	2061-3153
	LChV1_R3seq	CCAGACGGATTCCCTCAGAT		
4	LChV1_F4seq	TACTCCCTGGGTTTATTGGAGT	1007	3106-4112
	LChV1_R4seq	GTCTGCAGAACTGGTAACTTCTA		
5	LChV1_F5seq	TTGATGTCGACGTTCAAGAGGT	1141	4054-5194
	LChV1_R5seq	TTCAAAGCTCCAACAGGCTT		
6	LChV1_F6seq	CGCTGTCCTTACTGTTGGAG	1125	5024-6148
	LChV1_R6seq	AACATCATCTCACTAATTTGAGTCG		
7	LChV1_F7seq	AGACAGTGATAGATTGTCCACTATG	1096	6065-7160
	LChV1_R7seq	AGACAAGGCAAATCTATATCGGAA		
8	LChV1_F8seq	GTCTTTCGAGTGTTTCATGCTGT	1207	7040-8246
	LChV1_R8seq	TTCTCGAAGAATCTGACAGGGT		
9	LChV1_F9seq	CGATTTTGGCATGGACGCAA	1172	8127-9298
	LChV1_R9seq	GCTTTATCTATGTCTCTACCACCA		
10	LChV1_F10seq	AGTTTTTCGATTTTGGTGGAGGT	1114	9179-10 292
	LChV1_R10seq	ACAGTCGAACTACCAAGCGT		

Číslo sady	Označení	Sekvence (5'--- 3')	Velikost produktu (nt)	Pozice produktu
11	LChV1_F11seq	ACCGAATTAGGAATGAAATTGGAGA	1198	10 222-11 423
	LChV1_R11seq	GCATTGACGTCTTTCGCAGA		
12	LChV1_F12seq	TGAAGAATTTTCAGCACGACAA	806	11 340-12 145
	LChV1_R12seq	TGGGATTAACCAGATAGGTTTGACA		
13	LChV1_F13seq	AATGGCAGAGGCTGCATTCAAAA	742	12 064-12 805
	LChV1_R13seq	AGGAGTCAACTGCACACCAGA		
14	LChV1_F14seq	TCTGTTCAACTGGCAAGCAC	674	13 169-13 842
	LChV1_R14seq	GTGTGCAGGTCCGTCATTCA		
15	LChV1_F15seq	CGGTTGAAGTGAATGGGGTT	1061	13 616-14 676
	LChV1_R15seq	AGGCTCATCATCACTGTCTGA		
16	LChV1_F16seq	GATTAACGACCCAAGAGCACG	1259	15 188-16 446
	LChV1_R16seq	TTGTTACGAATTCCGTTGCG		
9*	LChV1_6for	CCTCTCTGAGGTGAATGGAGTG	670	14 551-15 220
	LChV1_2rev	CCCAATCACTTCGTGCTCTTGAG		

Obrázek č. 4: Všechny sady primerů použité pro PCR amplifikaci izolátů LChV1



1 - primery LChV1; 2 - primery LChV2; 3 - primery LChV3; 4 - primery LChV4; 5 - primery LChV5; 6 - primery LChV6; 7 - primery LChV7; 8 - primery LChV8; 9 - primery LChV9; 10 - primery LChV10; 11 - primery LChV11; 12 - primery LChV12; 13 - primery LChV13; 14 - primery 1LC_12776F/1LC_13223R ; 15 - primery LChV14; 16 - primery LChV15; 17 - primery LChV1_6for/LChV1_2rev; 18 - primery LChV16; 19 - primery LCV1U16390/LCV1L16809

6.5 Elektroforetická separace

PCR produkty byly vizualizovány po separaci v 1% agarózovém gelu. Gel vytvořený smícháním 50 ml rozvařeného roztoku agaróza/TAE a 3 μ l fluorescenčního barviva GoodView byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Do první jamky byly napipetovány 2 μ l standardu molekulární hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Do dalších jamek bylo pipetováno vždy po 3 μ l jednotlivých PCR produktů.

Elektroforetická separace probíhala při 80 V po dobu 40-45 minut. Výsledek separace byl vizualizován pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene.

6.6 Izolace PCR produktu z gelu

Izolace pozitivních PCR produktů byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle návodu výrobce, s modifikací v koncovém elučním kroku. Nukleová kyselina, navázaná na kolonce, byla eluována 30 μ l destilované vody místo doporučených 50 μ l. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí fluorimetru DyNA Quant 200.

6.7 Klonování PCR produktů

PCR produkty odpovídající jednotlivým genomickým fragmentům byly zaklonovány do plazmidu pGEM-T. Nejprve byla připravena ligační směs: 5 μ l pGEM-T ligační pufr, 1 μ l ligázy, 0,5 μ l pGEM-T plazmidu a 3,5 μ l PCR produktu. Takto namíchaná směs byla inkubována přes noc při 4 °C. Zároveň bylo připraveno LB kultivační médium, a to smícháním 4,75 g agaru, 6,25 g LB a 250 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno autoklávováním. Do 250 ml připraveného LB média bylo přidáno 250 μ l ampicilinu, a poté bylo médium rozlito do připravených misek.

Následující den bylo smícháno 50 μ l kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene DH5 α a 5 μ l ligační směsi a inkubováno na ledě po dobu 20 minut. Transformace byla provedena pomocí teplotního šoku při 42 °C po dobu 45 s. Zkumavky byly ihned umístěny na led a inkubovány další 2 min. Do každé zkumavky bylo přidáno 850 μ l SOC média a zkumavky byly inkubovány na rotační třepačce (30 rpm) po dobu 1,5 hod při 37 °C.

Mezitím bylo na povrch ztuhlého LB/Amp média napipetováno 40 μ l X-Gal a 4 μ l IPTG a rozetřeno pomocí sterilní kultivační kličky.

Po inkubaci byla suspenze transformovaných bakterií zkoncentrována centrifugací po dobu 2 min při 5000g. Poté bylo ze zkumavky odpipetováno cca 850 μ l supernatantu, sediment byl resuspendován ve zbytku suspenze, přepipetován na povrch média a rozetřen kličkou. Misky byly inkubovány přes noc ve tmě při 37 °C.

Pozitivní bílé kolonie byly přeneseny pomocí sterilních párátek na nová LB/Amp média. Misky byly opět kultivovány přes noc při 37 °C. Zároveň bylo provedeno ověření pozitivních kolonií pomocí PCR reakce, za použití primerů M13 (M13F - 5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3'; M13R - 5' -AACAGCTATGACCATG-3'). Z každé kultivační misky bylo vybráno pro testování 5 pozitivních transformovaných kolonií. Reakční směs ve složení: 5 μ l pufru (5x), 19,3 μ l H₂O, 0,25 μ l M13F primeru (20 pmol/ μ l), 0,25 μ l M13R primeru (20 pmol/ μ l) a 0,2 μ l Taq polymerázy (5U/ μ l), byla napipetována do zkumavek, do kterých byly následně pomocí párátek přeneseny bakterie z jednotlivých kolonií. PCR amplifikace probíhala za podmínek: počáteční denaturace 95 °C po dobu 5 min; denaturace při 95 °C po dobu 30 s, hybridizace primerů při 55 °C po dobu 30 s, prodlužování primerů při 72 °C po dobu 1 min; 35 cyklů; konečné prodlužování při 72 °C po dobu 10 min.

Výsledek PCR reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu. Od každého vzorku byly vybrány 3 pozitivní PCR produkty, které byly následně izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu.

6.8 Sangerovo sekvencování

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Vzorky byly naředěny na požadovanou finální koncentraci 25-40 ng/ml, podle předpokládané velikosti produktů. Reakční směs byla připravena smícháním 1 μ l Big Dye Ready Reaction Premix (2,5x), 1 μ l BigDye Sequencing Buffer (5x) a 2 μ l M13F/M13R primeru (1,6 pmol/ μ l). K reakční směsi bylo přidáno 6 μ l příslušného vzorku. Reakce v termocykleru probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace při 96 °C po dobu 1 min, 40 cyklů denaturace při 96 °C po dobu 10 s, hybridizace primerů při 50 °C po dobu 5 s, prodlužování primerů při 50 °C po dobu 4 min.

Vlastní sekvenování bylo provedeno pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, Olomouc.

6.9 Bioinformatická analýza

Výstupy, které byly získány sekvenováním jednotlivých zaklonovaných PCR produktů, byly sestaveny do výsledných kontigů pomocí programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.). Sestavené kontigy byly porovnány s příslušnými téměř celogenomickými sekvencemi z NGS, v případě izolátu Apr153 byly kontigy porovnávány se sekvencí izolátu UW2 (Acc. No. NC_001836). Sekvence vykazující největší shodu při porovnání v programu ClustalW v MEGA7 byly použity pro sestavení celogenomické sekvence. Tyto sekvence byly pomocí mnohočetného alignmentu v programu ClustalW v MEGA7 porovnány se sekvencemi LChV1, dostupnými v databázi GenBank. Byla provedena fylogenetická analýza neighbor-joining metodou v programu MEGA7, a to v rámci jak celého genomu, tak v rámci RdRp, plášťového proteinu a HSP70h proteinu. Výsledné fylogenetické stromy byly vizualizovány v programu Tree Explorer (MEGA7).

6.10 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

6.10.1 Použité chemikálie

Agarose ITM Biotechnology Grade (Amresco, kat. č. 9012-36-2)

LB Broth High Salt (Duchefa Biochemie B.V., kat. č. L1704)

Micro Agar (Duchefa Biochemie B.V., kat. č. M1002)

Deionizovaná voda

Izopropanol (Lach-Ner, kat. č. 20037-AT0)

GeneRulerTM 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0321)

GoodViewTM Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, kat. č. HGV2)

70% ethanol (Lach-Ner, kat. č. 20025-U99-M1000-1)

6.10.2 Použité soupravy

BioScript Reverse Transcriptase (Bioline, kat. č. BIO-27036)

MyTaq Red DNA Polymerase (Bioline, kat. č. BIO-21110)

Primery M13, LCV1U16390/LCV1L16809, 1LC_12776F/1LC_13223R, LChV1_1-16, LChV1_6for/LChV1_2rev (Generi Biotech)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28706)

Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen, kat. č. 25850)

pGEM-T Vector system kit (Promega, kat. č. A1360)

Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337455)

6.10.3 Použité roztoky a jejich příprava

1% roztok ethidium bromidu ve vodě (Sigma – Aldrich, kat. č. E1510)

1x TAE pufr (40 mM Tris base, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA)

Ampicilin (100 µg/µl) (Duchefa Biochemie B.V., kat. č. A0104)

IPTG (Duchefa Biochemie B.V., kat. č. I1401): 2 g IPTG rozpustit v 8 ml dest. vody, doplnit do 10 ml, sterilizovat přes filtr, 200mg/ml

X-Gal (Duchefa Biochemie B.V., kat. č. X1402): 20mg/ml, rozpustit v dimethylformamidu

SOC médium (Sigma-Aldrich, kat. č. S1797)

6.11 Použité přístroje

Analytické váhy A&D EK 200G (A&D Co. Ltd.)

Analytické váhy AE 240 (METTLER)

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)

Digitální termoblok AccuBlock D1100 (Labnet)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)

Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hoefer)

Inkubátor TH 30 s třepačkou SM 30 (Edmund Bühler GmbH)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Míchačka laboratorní Ika RCT basic (IKAMAG)

Mikrovltná trouba MA 85050 (OTF)

Minicentrifuga PrismTM Mini Centrifuge (Labnet)

Minicentrifuga Spectrafuge C1301-B Mini (Labnet)

Mini rotátor Bio RS-24 (Biosan Ltd.)

NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)

Termocycler T100TM (Bio-Rad)

Termocycler T-Gradient (Biometra)

Termocycler T-Personal (Biometra)

UV transluminátor Syngene G:Box - dokumentační systém GeneSnap (Herolab)

UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)

Vortex MS2 Minishaker (IKA)

Výrobník šupinkového ledu Icematic F100, Compact Ice flakem (Gemini FV)

Zdroj stejnosměrného proudu MP-250V (Major Science)

Zdroj stejnosměrného proudu Power Station 300V (Labnet)

7 VÝSLEDKY

V experimentální části byly použity vzorky listů ze 4 stromů meruňky obecné (*Prunus armeniaca*). Všechny tyto vzorky pocházely z genové banky teplomilných peckovin udržované v rámci Mendelovy univerzity v Brně na Zahradnické fakultě v Lednici na Moravě.

U izolátů Apr156, Apr161 a Apr172 byla izolována siRNA pomocí Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen), a následně byly vzorky sekvenovány pomocí NGS platformy MiSeq (Illumina). Celkově bylo u izolátu Apr156 získáno 3 972 907 'readů', po trimování na velikost 15-35 nt zůstalo 3 271 556 'readů'. Pro izolát Apr161 bylo získáno 5 123 557 'readů' (po trimování 4 420 115 'readů') a pro izolát Apr172 bylo získáno 5 597 151 'readů' (po trimování 4 924 675 'readů'). U izolátu Apr156 bylo namapováno 12 274 'readů' o průměrné délce 23,1 nt, u izolátu Apr161 bylo namapováno 50 732 'readů' o průměrné délce 22,6 nt a u izolátu Apr172 bylo namapováno 22 18 328 'readů' o průměrné délce 22,6 nt (viz Tabulka č. 4). Získaná data byla zpracována pomocí programu Geneious 9.1.8. metodou mapování na referenční sekvenci UW2 (Acc. No. NC_001836) (viz Tabulka č. 4). Izoláty byly následně přesekvenovány Sangerovým sekvenováním, pro ověření získaných sekvencí a zaplnění mezer ve scaffoldech.

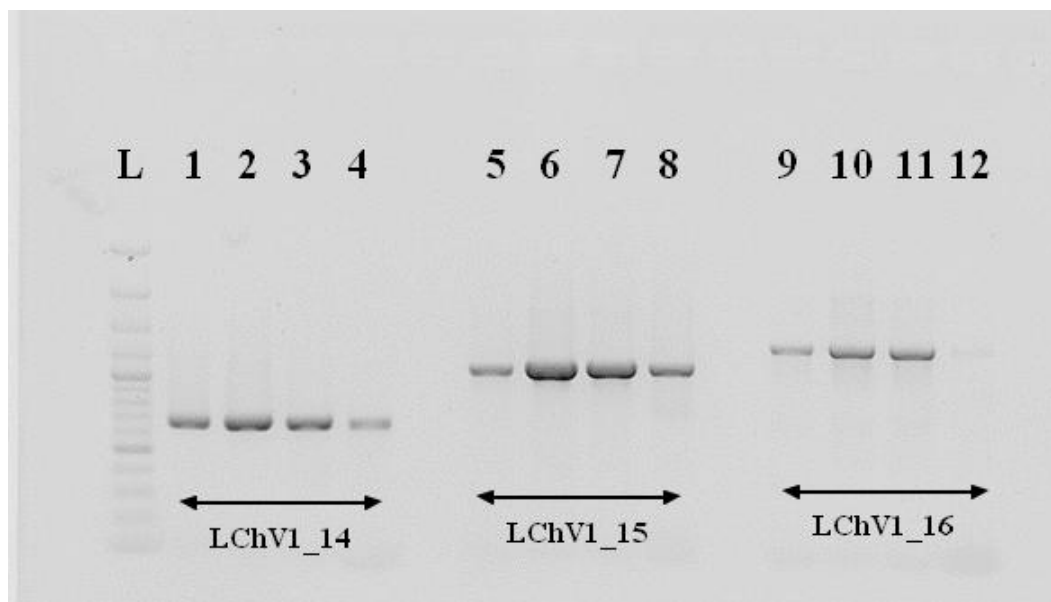
Tabulka č. 4: Data získaná NGS sekvenováním na platformě MiSeq a analýzou v programu Geneious

Izolát	Počet namapovaných 'readů'	Průměrná délka 'readů'	Průměrné pokrytí 'readů'	Pokryto referenční sekvence (%)	Identita s referenční sekvencí (%)
Apr156	12 274	23,1	15,4	86,4	86,4
Apr161	50 732	22,6	65,5	98,1	78,7
Apr172	18 328	22,6	23,2	94,2	87,1

Byla provedena izolace RNA pomocí Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen) u všech vzorků. Na základě RT-PCR amplifikace byly stanoveny celogenomové sekvence všech 4 izolátů. Pomocí použitých primerů, pokrývajících téměř celý genom,

se podařilo získat PCR produkty u všech izolátů, kdy výsledky PCR amplifikace byly ověřeny separací PCR produktů v 1% agarózovém gelu (viz Obrázek č. 5).

Obrázek č. 5: Příklad detekce LChV1 pomocí RT-PCR amplifikace, použity primery LChV1_14, LChV1_15 a LChV1_16



L - GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder; 1, 5, 9 - izolát Apr153; 2, 6, 10 - izolát Apr156; 3, 7, 11 - izolát Apr161; 4, 8, 12- izolát Apr172; LChV1_14, LChV1_15, LChV1_16 - označení použité sady primerů

PCR produkty byly vyizolovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Následně byly tyto PCR produkty, kromě fragmentů LCV1U16390/LCV1L16809 a 1LC_12776F/1LC_13223R, zaklonovány do plazmidů pGEM-T. Plazmidy obsahující požadované PCR fragmenty byly transformovány do bakterií *E. coli* kmene DH5 α . Od každého PCR produktu byly vybrány 3 pozitivní kolonie, v případě fragmentů Apr153/9, Apr153/15 a Apr153/16 byly použity pouze 2 kolonie. Tyto vybrané kolonie byly sekvenovány Sangerovým sekvenováním, za použití primerů M13F a M13R. Sekvenační výstupy byly spojeny do kontigů pomocí programu SeqMan Lasergene. V Tabulce č. 5 jsou uvedeny velikosti PCR fragmentů získaných sekvenováním v porovnání s očekávanými velikostmi segmentů.

Tabulka č. 5: Očekávané a získané velikosti PCR produktů LChV1 izolátů Apr153, Apr156, Apr161, Apr172

Použitá kombinace primerů	Očekávaná velikost PCR produktu (nt)	Získaná velikosti PCR produktu (nt)			
		Apr153	Apr156	Apr161	Apr172
LChV1_1	1089	1090	1090	1090	1090
LChV1_2	1286	1288	1288	1285	1288
LChV1_3	1093	1095	1095	1095	1095
LChV1_4	1007	1010	1009	1009	1008
LChV1_5	1141	1144	1140	1143	1144
LChV1_6	1125	1127	1127	1127	1134
LChV1_7	1096	1098	1098	1098	1098
LChV1_8	1207	1209	1210	1209	1209
LChV1_9	1172	1175	1174	1172	1174
LChV1_10	1114	1115	1115	1114	1115
LChV1_11	1198	1200	1200	1200	1200
LChV1_12	806	808	808	808	808
LChV1_13	742	744	744	745	744
LChV1_14	674	677	676	676	676
LChV1_15	1061	1063	1070	1063	1062
LChV1_16	1259	1259	1268	1259	1259
LChV1_6for/ LChV1_2rev	670	672	673	672	672
LCV1U16390/ LCV1L16809	420	419	419	419	419
1LC_12776F/ 1LC_13223R	448	449	449	449	449

Identita sekvencí pozitivních kolonií byla nejprve ověřena pomocí programu BLAST, poté byly tyto sekvence porovnány pomocí mnohočetného alignmentu pro stanovení jejich vzájemné variability. Bylo zjištěno, že 3 respektive 2 sekvence každého z PCR produktů nejsou zcela identické, ale vykazují pouze nízkou variabilitu.

Celogenomické sekvence pro všechny izoláty byly získány sestavením dílčích kontigů v programu SeqMan Lasergene. Pro složení celogenomické sekvence byly použity vždy ty sekvence, které vykazovaly nejvyšší identitu s příslušnou referenční sekvencí (viz Tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Stanovení variability mezi vybranými PCR produkty, zastupujícími jednotlivé genomické segmenty

	Vybraný PCR fragment	Identita (%)		Vybraný PCR fragment	Identita (%)
Izolát Apr153	1_3	92,5	Izolát Apr161	1_1	97,3
	2_5	94,5		2_2	98,8
	3_5	95,8		3_1	98,8
	4_2	95,8		4_1	99,3
	5_3	94,6		5_1	98,8
	6_4	95,6		6_2	98,9
	7_5	94,6		7_2	98,5
	8_3	97,3		8_2	99,3
	9_1	86,6		9_2	98,8
	10_1	95,9		10_3	98,7
	11_2	95,5		11_1	98,5
	12_1	97,5		12_3	98,4
	13_1	93,6		13_1	99,5
	14_1	90,7		14_2	99,3
	15_3	93,8		15_2	99,6
	16_5	95,7		16_3	99,0
9*_15	93,0	9*_1	99,1		

	Vybraný PCR fragment	Identita (%)		Vybraný PCR fragment	Identita (%)
Izolát Apr156	1_2	93,8	Izolát Apr172	1_1	99,6
	2_1	93,9		2_5	97,9
	3_4	94,0		3_2	99,2
	4_3	94,6		4_5	99,2
	5_5	96,2		5_4	98,8
	6_5	94,9		6_1	96,7
	7_5	93,7		7_4	98,2
	8_6	95,8		8_4	97,6
	9_4	97,3		9_2	98,9
	10_2	97,8		10_4	98,7
	11_4	97,6		11_2	99,0
	12_5	97,7		12_2	98,8
	13_2	93,9		13_3	99,0
	14_1	97,8		14_2	97,7
	15_3	96,9		15_1	98,3
	16_1	95,5		16_4	96,6
9*_24	92,7	9*_31	93,2		

označení PCR fragmentu: X_Y; X - číslo použité sady primerů, Y - číslo vybraného pozitivního klonu

Pomocí programu SeqMan byly vybrané nejvíce identické sekvence pospojovány do výsledných téměř celogenomických sekvencí. Sekvence izolátů Apr156, Apr161 a Apr172 byly použity pro ověření získaných NGS scaffoldů a zaplnění mezer. Byla poskládána sekvence izolátu Apr153 o velikosti 16 801 nt, sekvence izolátu Apr156 o délce 16 841 nt, sekvence izolátu Apr161 o velikosti 16 842 nt a sekvence izolátu Apr172 o velikosti 16 834 nt. U všech izolátů chybí část 3' nepřekládané koncové oblasti.

Získané sekvence jednotlivých českých izolátů byly vzájemně porovnány pomocí algoritmu ClustalW a distanční analýzy v programu MEGA7, kdy bylo zjištěno, že izoláty nejsou zcela identické. Izolát Apr153 byl nejvíce odlišný, protože vykazoval identitu s ostatními izoláty pouze 93,4 %. Identita izolátu Apr172 s izoláty Apr156 a Apr161 byla 95,8 %. Nejvyšší identita byla pozorována mezi izoláty Apr156 a Apr161, a to 99,2 %.

Sekvence byly porovnány pomocí programu BLAST s dostupnými sekvencemi z databáze GenBank. Sekvence izolátu Apr153 vykazovala 95% identitu s německým izolátem UW (Acc. No. Y10237) 94% identitu s italským izolátem ITMAR (Acc. No. EU715989). Sekvence izolátů Apr156, Apr161 a Apr172 vykazovaly identitu 94 % s německým izolátem UW (Acc. No. Y10237) a 93 % s italským izolátem ITMAR (Acc. No. EU715989).

Z databáze NCBI byly získány sekvence jednotlivých čtecích rámců referenční sekvence. V programu MEGA7 byly tyto sekvence porovnány se sekvencemi testovaných izolátů pomocí mnohočetného alignmentu pro ověření velikostí čtecích rámců u izolátů Apr153, Apr156, Apr161 a Apr172. U všech 4 testovaných izolátů byly získány čtecí rámce o stejné velikosti. Čtecí rámec ORF1a o velikosti 6 906 nt (2 301 aa) byl lokalizován na pozici 76 - 6 981 nt. Dále byly získány čtecí rámce ORF1b (6 950 - 8 497 nt) o velikosti 1 548 nt (516 aa), ORF2 (8 502 - 8 612 nt) o velikosti 111 nt (36 aa), ORF4 (10 429 - 11 982 nt) o velikosti 1 554 nt (517 aa), ORF5 (12 062 - 13 276 nt) o velikosti 1 215 nt (404 aa), ORF6 (13 282 - 15 267 nt) o velikosti 1 986 nt (661 aa), ORF7 (15 422 - 15 967 nt) o velikosti 546 nt (181 aa) a ORF8 (16 004 - 16 723 nt) o velikosti 720 nt (239 aa). Tyto velikosti odpovídaly délkám čtecích rámců u referenčního izolátu UW2. U čtecího rámce ORF3 (8 602 - 10 257 nt) testovaných izolátů byla získána sekvence o velikosti 1 656 nt (552 aa), tedy o 201 nt (67 aa) kratší než je čtecí rámec ORF3 u izolátu UW2. V rámci mnohočetného alignmentu byla sledována také genetická variabilita mezi testovanými izoláty a referenčním izolátem, jak na úrovni celého genomu, tak na úrovni sledovaných čtecích rámců.

U izolátu Apr153 byla vůči referenční sekvenci pozorována variabilita 5,3 %, což odpovídá 882 záměnám. Na úrovni aminokyselin byla variabilita 9,4 % (528 záměn). Mezi izolátem Apr156 a referenční sekvencí byla variabilita 5,6 % (949 záměn), na úrovni aminokyselin byla variabilita 9,9 % (555 záměn). U izolátu Apr161 byla variabilita 5,7 % (949 záměn) a aminokyselinové složení se lišilo od referenčního genomu o 10 % (562 záměn). Nejvyšší variabilita vůči referenční sekvenci byla pozorována u izolátu Apr172, a to 5,8 % (976 záměn) na úrovni nukleotidů a 10,2 % (571 záměn) na úrovni aminokyselin.

V rámci RdRp byla nejvyšší variabilita pozorována u izolátu Apr153, kdy variabilita vůči referenční sekvenci byla 5,3 % (76 záměn). Na úrovni aminokyselin se sekvence lišily o 2,3 % (11 záměn). Sekvence izolátů Apr156 a Apr161 vykazovaly variabilitu 4,5 % (65 záměn) a 4,4 % (63 záměn). Na úrovni aminokyselin byla variabilita 1 % (5 záměn).

Variabilita vůči referenčnímu genomu byla u izolátu Apr172 4,3 % (62 záměn), u sledu aminokyselin bylo 7 záměn (1,5 %).

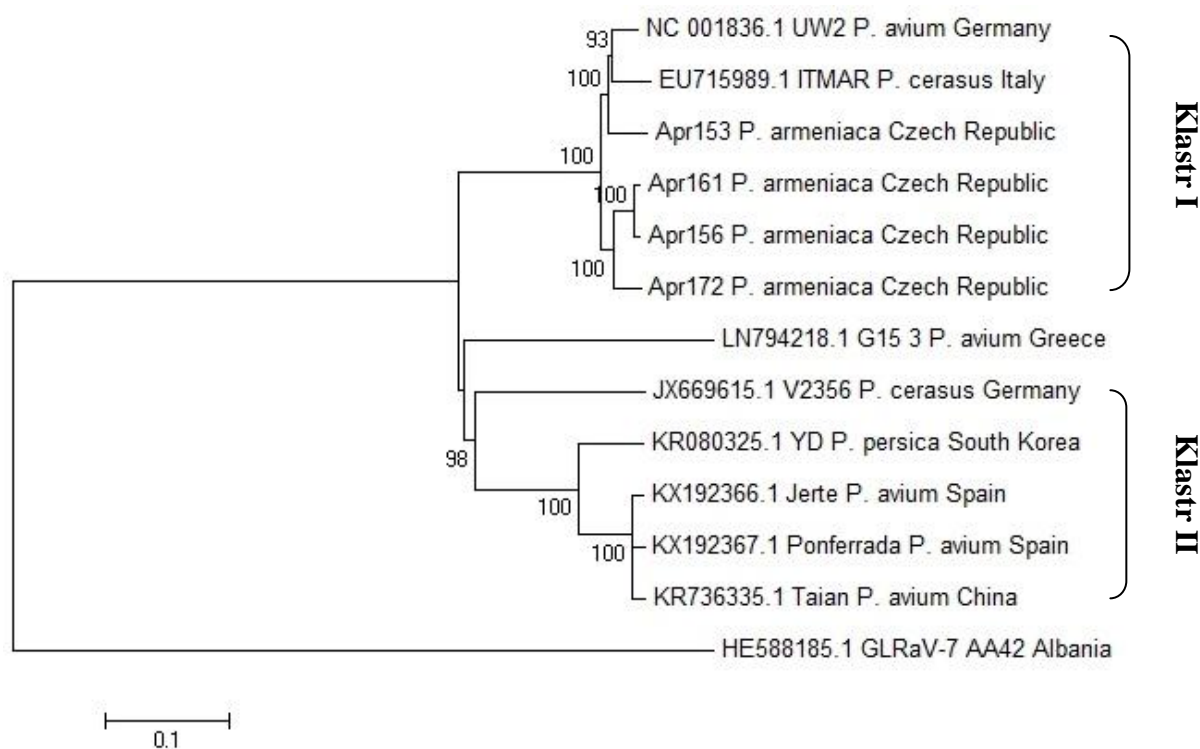
Vysoká variabilita u izolátu Apr153 byla pozorována také v rámci HSP70h proteinu, kdy na úrovni nukleotidové sekvence byla variabilita 9 % (166 záměn) a na úrovni aminokyselin 6,6 % (41 záměn). U izolátů Apr156, Apr161 a Apr172 byla variabilita podstatně nižší, tedy 4,5 % (83 záměn a 84 záměn) a 4,8 % (90 záměn). Na úrovni aminokyselin byla variabilita 2,9 % (18 záměn), 3 % (19 záměn) a 2,9 % (18 záměn).

U sekvence pláštěvého proteinu byla pozorována celkově vyšší variabilita oproti ostatním pozorovaným sekvencím. U izolátu Apr153 byla variabilita 5,7 % (69 záměn), v rámci aminokyselin bylo 26 záměn (6,4 %). Mezi izolátem Apr156 a referenčním genomem bylo 92 nukleotidových záměn (7,6 %) a 30 aminokyselinových záměn (7,4 %). Sekvence izolátu Apr161 vykazovala 7,5% variabilitu (91 záměn) na úrovni nukleotidů a 7,2% variabilitu (29 záměn) na úrovni aminokyselin. U izolátu Apr172 byla variabilita vůči referenčnímu genomu 6,7 %. Na úrovni aminokyselin byla variabilita 7,2 % (29 záměn).

U čtecího rámce ORF8 byla sledována variabilita v rámci koncové oblasti (100 nt). Všechny testované izoláty vykazovaly stejnou variabilitu, tedy 5 % (5 záměn) na úrovni nukleotidů a 3 % (1 záměna) na úrovni aminokyselin.

Z databáze GenBank byly získány dostupné celogenomické sekvence a sekvence genů pro RdRp, pláštěvý protein a HSP70h-like protein. Pomocí mnohočetného alignmentu byly sekvence z databáze přiřazeny k sekvencím testovaných izolátů. Pomocí programu MEGA7 byla provedena fylogenetická analýza neighbor-joining metodou. Výsledný fylogenetický strom potvrdil, že nejbližšími příbuznými jsou německý izolát UW2 (Acc. No. Y10237) z *Prunus avium* a italský izolát ITMAR (Acc. No. EU715989) z *Prunus cerasus*. Tyto dva izoláty vytvořily spolu s testovanými českými izoláty společnou větev (klastr I). Řecký izolát G15_3 (Acc. No. LN794218) z *P. avium* vytvořil zcela samostatnou větev. Druhý klastr vytvořily španělské izoláty Jerte (Acc. No. KX192366) a Ponferrada (Acc. No. KX192367) z *P. avium*, čínský izolát Taian (Acc. No. KR736335) z *P. avium*, německý izolát V2356 (Acc. No. JX669615) z *P. cerasus* a izolát YD (Acc. No. KR080325) z *P. persica*, pocházející z Jižní Korey (viz Obrázek č. 6).

Obrázek č. 6: Fylogenetický strom izolátů LChV1

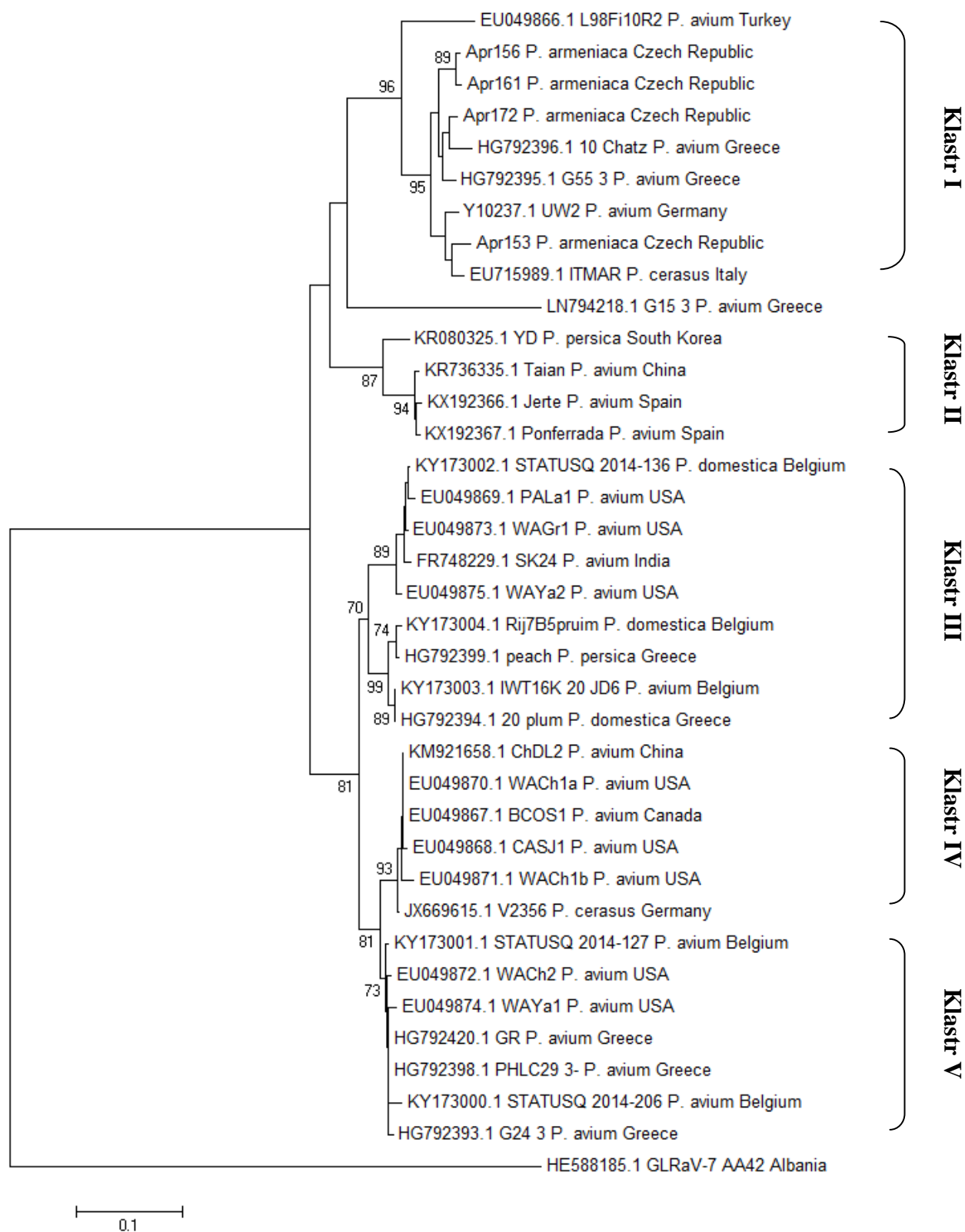


Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,1 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty ≥ 70 . Jako outgroup použit izolát AA42 GLRaV-7 (HE588185.1).

Další fylogenetické analýzy byly provedeny pro části genů kódujících RNA dependentní RNA polymerázu, HSP70h-like protein a plášťový proteiny.

U RdRp vytvořily testované meruňkové izoláty společnou větev s evropskými izoláty UW2, G 55 3, 10 Chatz a L98Fi10R2 z *P. avium* a ITMAR z *P. cerasus* (klastř I). Dalším nejbližším příbuzným je řecký izolát G 15 3 z *P. avium*, tvořící zcela samostatnou větev. Druhou větev vytvořily španělské izoláty Jerte a Ponferrada a čínský izolát Taian z *P. avium* a izolát YD z Jižní Koree z *P. persica* (klastř II). Další skupinu vytvořily belgický izolát 20 JD6 a americké a indické izoláty z *P. avium*, řecký izolát plum a belgické izoláty z *P. domestica* a řecký izolát peach z *P. persica* (klastř III). Čtvrtou větev tvoří třešňové izoláty z USA, Kanady a Číny a višňový izolát z Německa (klastř IV). Poslední větev vytvořily třešňové izoláty z Belgie, USA a Řecka (klastř V) (viz Obrázek č. 7).

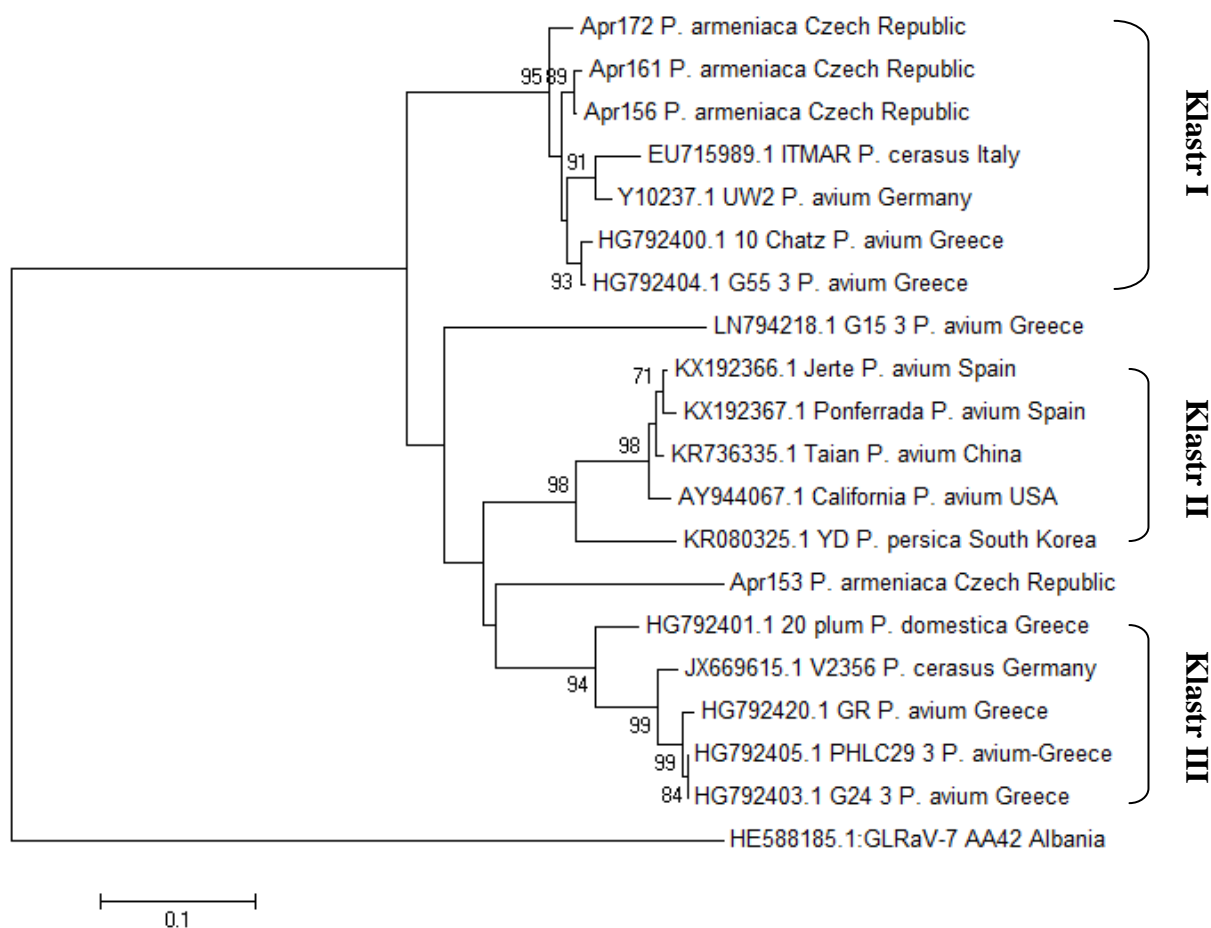
Obrázek č. 7: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - RdRp



Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítka představuje 0,1 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty ≥ 70 . Jako outgroup použit izolát AA42 GLRaV-7 (HE588185.1).

Z pohledu českých izolátů došlo v rámci HSP70h-like proteinu k vytvoření podobného větvení jako u RdRp. Nejblíže příbuznými k českým izolátům Apr156, Apr161 a Apr172 byly řecké izoláty z *P. avium*, německý izolát UW2 z *P. avium* a italský izolát ITMAR z *P. cerasus* (klastr I). Řecký izolát G 15 3 z *P. avium* opět vytvořil úplně samostatnou větev. Druhou skupinu vytvořily španělské izoláty z *P. avium* spolu s čínským a americkým izolátem z *P. avium* a korejským izolátem z *P. persica* (klastr II). Český izolát Apr153 z *P. armeniaca* vytvořil samostatnou větev. Třetí větev vytvořily řecké izoláty z *P. avium* spolu s německým izolátem z *P. cerasus* (klastr II) (viz Obrázek č. 8).

Obrázek č. 8: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - HSP70h

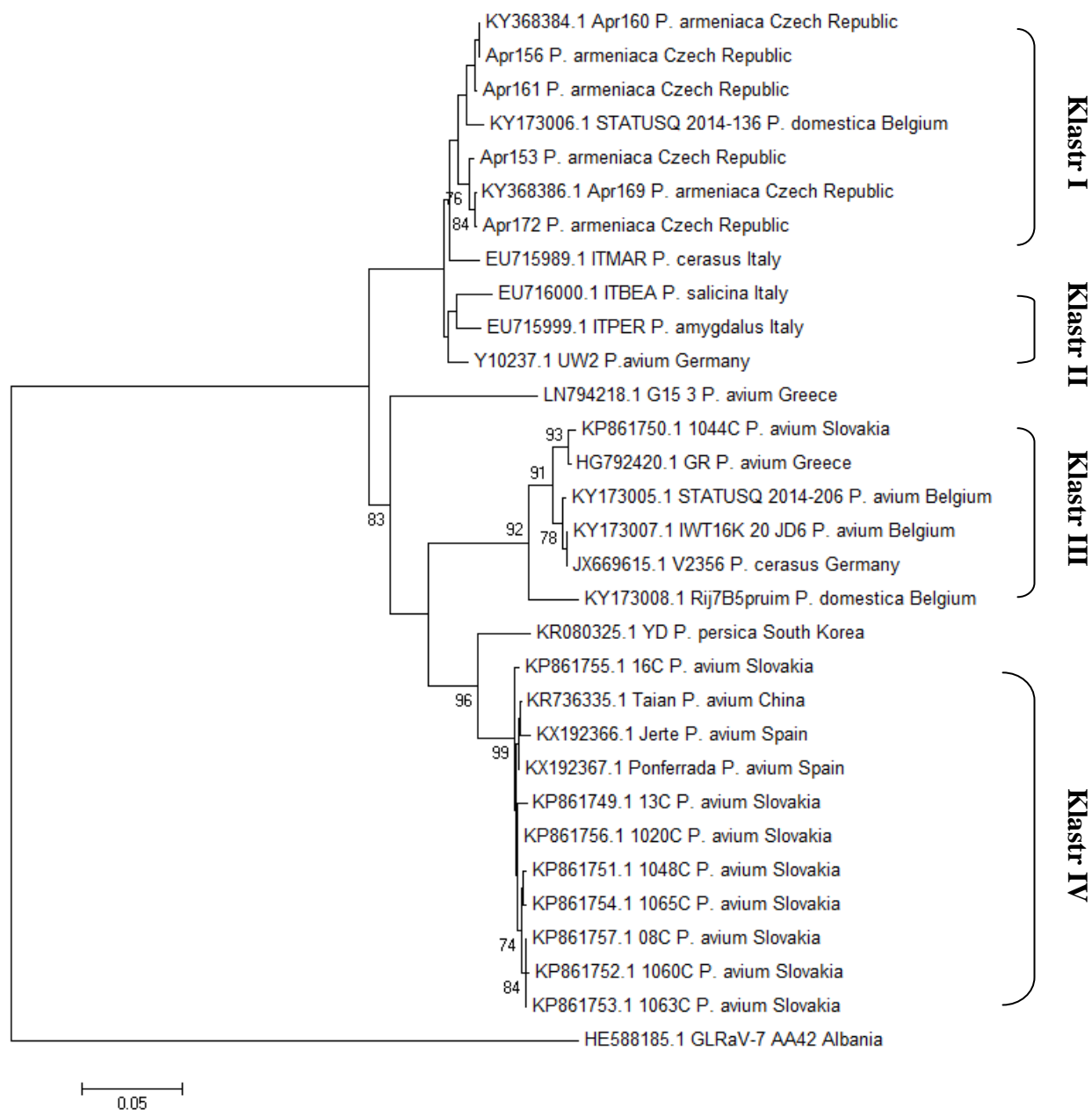


Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,1 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty ≥ 70 . Jako outgroup použit izolát AA42 GLRaV-7 (HE588185.1).

Z fylogenetického stromu pro čtecí rámec kódující plášťový protein vyplývala příbuznost českých izolátů s belgickým izolátem z *P. domestica* a italským izolátem z *P. cerasus* (klastr I). Dalšími nejpodobnějšími izoláty jsou italské izoláty z *P. salicina*

a *P. amygdalus* a německý izolát z *P. avium* (klastr II). Třetí skupinu vytvořily belgické izoláty z *P. avium* a *P. domestica*, německý izolát z *P. cerasus* a slovenský a řecký izolát z *P. avium* (klastr III). Poslední větev vytvořily třešňové izoláty pocházející ze Slovenska, Španělska a Číny (klastr IV). Řecký izolát G 15 3 z *P. avium* a korejský izolát z *P. persica* vytvořily zcela individuální větve (viz Obrázek č. 9).

Obrázek č. 9: Fylogenetický strom izolátů LChV1 - CP



Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty ≥ 70 . Jako outgroup použit izolát AA42 GLRaV-7 (HE588185.1).

Z fylogenetických stromů izolátů LChV1 zpracovaných pro celogenomické sekvence a vybrané čtecí rámce není patrná hostitelská ani geografická specifita. Jednotlivé klastry byly tvořeny izoláty pocházejícími z různých hostitelských rostlin a z různých zemí světa, pouze v některých případech byly klastry vytvořeny výhradně evropskými izoláty. České izoláty pocházející z *P. armeniaca* vytvořily obdobné větvení jak v rámci celogenomických sekvencí, tak v rámci čtecího rámce kódujícího RdRp a CP. U čtecího rámce kódujícího HSP70h-like protein došlo k osamostatnění českého izolátu Apr153.

8 DISKUZE

Little cherry virus 1 patří mezi celosvětově rozšířené viry napadající peckoviny. Jeho výskyt byl pozorován především v oblastech, kde jsou komerčně pěstované hostitelské rostliny z rodu *Prunus*. Nejčastěji byla infekce LChV1 popsána na třešních (*P. avium*) a višních (*P. cerasus*). Mezi další běžné hostitele patří slivoně (*P. domestica*), broskvoně (*P. persica*), mandloně (*P. amygdalus*) a okrasné druhy třešní. *Little cherry virus 1* je také spojován s významným virovým onemocněním Little cherry disease (Németh, 1986; Matic a kol., 2007; Jelkmann a Eastwell, 2011; Jeger a kol., 2017). V České republice byl LChV1 poprvé popsán v roce 2011 na třešních a višních (Ludvíková a Suchá, 2011). V roce 2017 byl LChV1 poprvé popsán na meruňkách (*P. armeniaca*) (Šafářová a kol., 2017).

V rámci experimentální části diplomové práce byl LChV1 detekován u 4 testovaných vzorků z meruňek (*P. armeniaca*), kdy cílem experimentu bylo získat jejich celogenomické sekvence. U všech izolátů byly získány téměř celogenomické sekvence s chybějící částí 3' nepřekládaného konce. Jedná se o první téměř celogenomické sekvence pocházející z infikovaných meruňek jakožto nové hostitelské rostliny. Tyto sekvence se nejvíce podobají první popsané celogenomické sekvenci izolátu UW z *Prunus avium* z Německa.

U LChV1 byla popsána vysoká variabilita mezi izoláty, které pochází z různých zemí a různých hostitelů. Obecně je popisována genetická variabilita na úrovni nukleotidů až 25 % (Katsiani a kol., 2015; Jeger a kol., 2017). Tyto hodnoty jsou mnohem vyšší, než bylo zjištěno při porovnání českých izolátů s nejbližším příbuzným izolátem UW2 z Německa. Celkově české izoláty vykazovaly vůči referenčnímu genomu variabilitu okolo 5 - 6 %. Oproti tomu při porovnání českých izolátů se vzdálenějším příbuzným izolátem Taian z Číny byla zjištěna variabilita zhruba 23,5 %. Na úrovni aminokyselin se variabilita vůči referenčnímu genomu pohybovala v rozmezí 9 - 10 %.

Variabilita byla popsána především v rámci fragmentů RNA dependentní RNA polymerázy, plášťového proteinu a 3' konce ORF8 (Katsiani a kol., 2015; Wang a kol., 2016; Jeger a kol., 2017). V rámci čtecího rámce kódujícího RdRp byla variabilita 4 - 5 % a v rámci čtecího rámce kódujícího HSP70h-like proteinu byla variabilita 4 - 9 %. U obou čtecích rámců byla nejvyšší variabilita pozorována v případě izolátu Apr153. U čtecího rámce kódujícího plášťový protein byla pozorována celkově vyšší variabilita, která se pohybovala v rozmezí 5 - 8 %. U čtecího rámce ORF8, kde byla sledována variabilita v rámci posledních 100 nt, byla variabilita stejná u všech 4 českých izolátů, a to 5 %. I na základě dílčích sekvencí sledovaných čtecích rámců byla variabilita spíše nižší, stejně jako celková variabilita

na úrovni genomu. Pro porovnání byla opět sledována variabilita mezi sekvencemi čtecích rámců českých izolátů a čínského izolátu Taian. Mezi porovnávanými sekvencemi čtecího rámce ORF1a byla variabilita 17,8 %. U čtecího rámce ORF3 byla variabilita 20,5 % a u čtecího rámce ORF5 se variabilita pohybovala okolo 24 %. Také v rámci koncové části čtecího rámce ORF8 byla pozorována zvýšená variabilita, tedy 12 - 13 %. Podle zjištěných údajů lze tyto čtecí rámce označit za variabilní oblasti. I přes velký počet nukleotidových záměn nebyla variabilita u sledu aminokyselin příliš vysoká, což bylo pravděpodobně způsobeno výskytem tichých mutací.

U čtecího rámce ORF3 (HSP70h protein) byla popsána jednonukleotidová inserce způsobující předčasné zařazení stop kodonu a zkrácení výsledného proteinu (Wang a kol., 2016). Tato jednonukleotidová inserce v rámci čtecího rámce ORF3 byla pozorovaná také u českých izolátů Apr153, Apr156, Apr161 a Apr172, a to na pozici 10 247, kde byl navíc zařazen adenin. Stejná inserce byla nalezena také u ostatních dostupných celogenomických sekvencí kromě izolátů UW2 z Německa a ITMAR z Itálie. Tato inserce měla za důsledek zařazení stop kodonu o 201 nt dříve (67 aa) než u referenčního genomu a produkci zkráceného proteinu.

Kromě variabilních míst uvedených ve vybraných publikacích byly u českých izolátů při porovnání s referenčním genomem popsány další změny v genomu. Na pozici 46 byla u českých izolátů spolu s izoláty ITMAR a YD nalezena delece adeninu. Na pozici 10 372 byla zjištěna delece dvou nukleotidů (GC). Dále byly identifikovány jednonukleotidové delece na pozicích 15 258, kde oproti referenční sekvenci chyběl adenin, a 15 393, kde chyběl cytosin. Tyto delece byly opět popsány také u ostatních celogenomových sekvencí, kromě sekvencí izolátů UW2 a ITMAR. Delece na pozici 15 258 způsobila zařazení stop kodonu a zkrácení čtecího rámce ORF6 o 3 aminokyseliny. Ostatní delece byly mimo čtecí rámce, tudíž neměly vliv na kódující čtecí rámce.

Fylogenetická analýza celogenomických sekvencí testovaných izolátů a dostupných sekvencí z databáze GenBank potvrdila popsáný stupeň genetické variability. Jednotlivé fylogenetické stromy se svým větvením od sebe mírně lišily. Především dendrogram pro čtecí rámec ORF3 (HSP70h protein) se lišil od ostatních v pozici českého izolátu Apr153, který vytvořil zcela samostatnou větev vzdálenou od ostatních českých izolátů. Tato změna odpovídá také počtu nukleotidových záměn u izolátu Apr153 oproti referenčnímu genomu. V každém fylogenetickém stromu byly nejbližšími příbuznými pro české izoláty německý izolát UW z *Prunus avium* a italský izolát ITMAR z *Prunus cerasus*. Vysokou variabilitu v rámci izolátů LChV1 je možné taktéž vysvětlit procesem rekombinace mezi izoláty

v průběhu evoluce. Tento závěr lze podpořit dřívějšími výzkumy ohledně rekombinací u virů z čeledi *Closteroviridae* (Karasev, 2000; Farooq a kol., 2013; Rubio a kol., 2013; Katsiani a kol., 2015).

Provedené fylogenetické analýzy neprokázaly hostitelskou ani geografickou specifitu u izolátů LChV1, protože nedošlo k vytvoření samostatných klastrů podle země původu nebo původního hostitele. Ve stejném klastru se nacházely evropské i neevropské izoláty z různých hostitelů. Tato zjištění potvrzují již dříve zjištěné větvení v rámci dendrogramů u LChV1 izolátů. Příbuznost mezi izoláty je pravděpodobně velmi ovlivněna mezinárodním pohybem infikovaného šlechtitelského materiálu (Jeger a kol., 2017). Lze tak např. vysvětlit blízkou příbuzností některých evropských izolátů s izoláty, které pochází z asijského a amerického kontinentu.

Výskyt LChV1 u meruňek v České republice poukazuje na další možnosti zkoumání tohoto viru v dalších zemích světa, a to jak v udržovaných genových zdrojích, tak v běžných nebo komerčních výsadbách. Jelikož se virus často vyskytuje ve formě směsných infekcí, tak nelze přesně určit, které příznaky v této směsi způsobuje samotný *Little cherry virus 1*. Další možností výzkumu je škodlivost LChV1 u meruňek, tedy viru samotného nebo v kooperaci s dalšími viry napadajícími meruňky.

9 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl detekován *Little cherry virus 1* u vzorků z *Prunus armeniaca*. Byly získány téměř kompletní celogenomické sekvence u všech testovaných izolátů. Sekvence izolátu Apr153 měla délku 16 801 nt, sekvence izolátu Apr156 měla velikost 16 841 nt, sekvence izolátu Apr161 měla velikost 16 842 nt a sekvence izolátu Apr172 měla velikost 16 834 nt. U testovaných izolátů byly získány kompletní sekvence všech čtecích rámců. Byla potvrzena genetická variabilita, která byla již dříve popsána u ostatních LChV1 izolátů. U čtecího rámce ORF3 byla zjištěna jednonukleotidová inserce, která měla za následek zkrácení výsledného proteinu. České izoláty vykazovaly nejvyšší identitu s německým izolátem UW2 z *Prunus avium* a italským izolátem ITMAR z *P. cerasus*. Tuto příbuznost potvrdily také provedené fylogenetické analýzy. Výsledky vyplývající z fylogenetických stromů rovněž potvrdily vysokou variabilitu izolátů LChV1 a nepřítomnost geografické a hostitelské specifity. Získané výsledky také ukazují na další možnosti studia LChV1 izolátů analyzováním eventuálních rekombinací a testováním meruňkových sadů na přítomnost LChV1.

10 SEZNAM VYUŽITÉ LITERATURY

- Bajet, N. B., Unruh, T. R., Druffel, K. L., Eastwell, K. C. (2008): Occurrence of two little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Disease* 92: 234-238.
- Candresse, T., Marais, A., Faure, C., Gentit, P. (2013): Association of *Little cherry virus 1* (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology* 103: 293-298.
- Dolja, V. V., Kreuze, J., Valkonen, J. P. T. (2006): Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117: 38-51.
- Elena, K., Alivizatos, A. S., Varveri, C. (2008): New plant pathogens reported in Greece, 1990-2007. *Hellenic Plant Protection Journal* 1: 1-25.
- EPPO (2001): Certification scheme for cherry. *OEPP/EPPO Bulletin* 31: 447 - 461.
- Erokhina, T. N., Zinovkin, R. A., Vitushkina, M. V., Jelkmann, W., Agranovsky, A. A. (2000): Detection of beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins in vivo using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 81: 597-603.
- Farooq, A. B., Ma, Y. X., Wang, Z., Zhuo, N., Wenxing, X., Wang, G. P., Hong, N. (2013): Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in *Grapevine leafroll-associated virus 3* in China. *Virus Research* 171: 15-21.
- Fiore, N., Fernandez, C., Quiroga, N., Pino, A. M., Rivera, L., Sagredo, K., Zamorano, A. (2018): First Report of *Little cherry virus 1* in Chile. *Plant Disease* (online).
- Fridlund, P. R. (1980): Glasshouse indexing for fruit tree viruses. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 15: 153-158.
- Fry, P. R., Wood, G. A. (1970): Little cherry virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 13: 111-118.
- Glasa, M., Benediktoová, D., Predajňa, L. (2015): First report od *Little cherry virus-1* i Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 97: 542.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses (2011): *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The 9th Report of the ICTV.* https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/

- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Martelli, G. P. (2012): New genus *Velarivirus* in the family *Closteroviridae* and new species *Cordyline Virus 1* to be assigned to the new genus.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus Taxonomy: 2016 Release EC 48, Budapest, Hungary, August 2016; Email ratification 2017 (MSL #31). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Isogai, M., Aoyagi, J., Nakagawa, M., Kubodera, Y., Satoh, K., Katoh, T., Inamori, M., Yamashita, K., Yoshikawa, N. (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70: 288–291.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Gregoire, J., Miret, J. A. J., MacLeod, A., Navarro, M. N., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., West, J., Chatzivassiliou, E., Winter, S., Hollo, G., Candresse, T. (2017): Pest categorisation of Little cherry pathogen (non-EU isolates). *EFSA Journal* 15.
- Jelkmann, W., Eastwell, K. C. (2011): Little cherry virus-1 and -2. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W.: *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 153-159.
- Jelkmann, W., Fechtner, B., Agranovsky, A. A. (1997): Complete genome structure and phylogenetic analysis of *little cherry virus*, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology* 78: 2067-2071.
- Jelkmann, W., Hergenahn, F., Berwarth, C. (2010): Transmission of *Little cherry virus -1* (LChV-1) by *Cuscuta europea* to herbaceous host plants. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 272-274.
- Jelkmann, W., Leible, S., Rott, M. (2008): Little cherry closteroviruses-1 and -2, their genetic variability and detection by real-time-PCR. *Acta horticulturae* 781: 321-330.
- Karasev, A. V.(2000): Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293–324.
- Katsiani, A. T, Pappi, P. G., Olmos, A., Efthimiou, C. E, Maliogka, V. I., Katis, N. (2017): Development of a real-time RT-PCR for the universal detection of LChV-1 and study of the seasonal fluctuation of the viral titer in sweet cherry cultivars. *Plant Disease*.

- Katsiani, A. T., Maliogka, V. I., Amoutzias, G. D., Efthimiou, K. E., Katis, N. I. (2015): Insights into the genetic diversity and evolution of *Little cherry virus 1*. *Plant Pathology* 64: 817–824.
- Komorowska, B., Cieślińska M. (2004): First Report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant Disease* 88: 909.
- Lim, S., Igori, D., Yoo, R. H., Zhao, F., Cho, I. S., Choi, G. S., Lim, H. S., Lee, S. H., Moon, J. S. (2015): Genomic detection and characterization of a Korean isolate of *Little cherry virus 1* sampled from a peach tree. *Virus Genes* 51: 260-266.
- Lu, M. G., Gao, R., Chen, R. R., Wu, B., Zhang, Z. X., Li, S. F. (2015): First Report of *Little cherry virus 1* in Sweet Cherry Trees in China. *Plant Disease* 99: 1191.
- Ludvíková, H., Suchá, J. (2011): First Report of Little Cherry Disease from Sweet Cherry (*Prunus avium*) and Sour Cherry (*P. cerasus*) in the Czech Republic. *Plant Disease* 95: 1197.
- Marais, A., Faure, C., Theil, S., Svanella-Dumas, L., Brans, Y., Maurice, I., Blin, V., Candresse, T. (2016): First report of Little cherry virus 1 on plum in France. *Plant disease* 100: 2544-2545.
- Martelli, G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J. S., Jelkmann, W., Katis, N. I., Maliogka, V. I., Melzer, M. J., Menzel, W., Rott, M. E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., Saldarelli, P. (2012): Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 94: 7-19.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Hu, J. S., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Martin, R. R., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J. (2011): “Family *Closteroviridae*,” in *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. eds King A., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E., editors. (Amsterdam: Elsevier-Academic Press) 987–1001.
- Matic, S., Minafra, A., Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V., Myrta, A., Martelli, G. P. (2009): 'Kwanzan Stunting' syndrome: detection and molecular characterization of an Italian isolate of *Little cherry virus 1*. *Virus Research* 143: 61-67.

- Matic, S., Myrta, A., Minafra, A. (2007): First report of *Little cherry virus 1* in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology* 89: S75.
- Matic, S., Myrta, A., Minafra, A. (2010): Detection of three closteroviruses in stone fruit trees by multiplex assays. *Journal of Plant Pathology* 92: 57-63.
- Mikona, C., Jelkmann, W. (2010): Replication of *Grapevine leafroll-associated virus -7* (GLRaV-7) by *Cuscuta* species and its transmission to herbaceous plants. *Plant Disease* 94: 471-476.
- Németh, M. V. (1986): Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Noorani, M. S., Awasthi, P., Sharma, M. P., Ram, R., Zaidi, A. A., Hallan, V. (2013): Simultaneous detection and identification of four cherry viruses by two step multiplex RT-PCR with an internal control of plant nad5 mRNA. *Journal of Virological Methods* 193: 103-107.
- Pringle, C. R. (1996): Virus Taxonomy 1996 - A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Archives of Virology* 141: 2251-2256.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2001): Detection and partial characterization of a second Closterovirus associated with Little Cherry Disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology* 91: 261-267.
- Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P. (2013): Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology* 4, 151. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00151>.
- Ruiz-Garcia, A. B., Martinez, C., Santiago, R., Garcia, M. T., de Prado, N., Olmos, A. (2016): First report of Little cherry virus 1 (LChV-1) in sweet cherry in Spain. *Plant disease* 100: 2340.
- Serçe, C. U., Gazel, M., Çaglayan, K. (2010): First report of *Little cherry virus 1* in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 93: S66.
- Šafářová, D., Faure, C., Candresse, T., Navrátil, M., Nečas, T., Marais, A. (2017): First report of Little cherry virus 1 infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Disease* 101: 845.

- Tahzima, R., Foucart, Y., Peusens, G., Beliën, T., Massart, S., Jonghe, K. de (2017): First Report of *Little cherry virus 1* affecting European Plum (*Prunus domestica*) in Belgium. *Plant Disease* 101: 1557.
- Tanaka, S., Hirose, K. (1966): Indexing for little cherry virus in Japanese flowering cherry. *Japanese Journal of Phytopathology* 32: 23-25.
- Theilmann, J., Mozafari, J., Reade, R., Wu, Z., Xie, W., Jespersen, G., Bernardy, M., Eastwell, K.C., Rochon, D. (2002): Partial nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of *Little cherry virus* and development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based diagnostic test. *Phytopathology* 92: 87-98.
- Theilmann, J., Orban, S., Rochon, D. (2004): High sequence variability among *Little cherry virus* isolates occurring in British Columbia. *Plant Disease* 88: 1092-1098.
- Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A., Jelkmann, W. (1997): Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 103: 803–808.
- Wang, J., Zhu, D., Tan, Y., Zong, Y., Wei, H., Hammond, R. W., Liu, Q. (2016): Complete nucleotide sequence of *little cherry virus 1* (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology* 161: 749-753.
- Wilks, J. M., Welsh, M. F. (1961): Host range studies of the little cherry disease virus. *Canadian Journal of Plant Science* 41:544-548.