

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2016**

**Veronika Ševčíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulární charakteristika**  
*Apple chlorotic leaf spot virus*

**Bakalářská práce**

**Veronika Ševčíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

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

Prohlášení:

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

V Olomouci dne.....

Podpis.....

## SOUHRN

Bakalářská práce byla zaměřena na molekulární charakteristiku a genetickou variabilitu *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), jakožto celosvětově rozšířeného patogena ovocných jaderovin a peckovin.

Teoretická část nejprve stručně shrnuje základní informace o ACLSV, charakterizuje rod *Trichovirus* a čeleď *Betaflexiviridae*, do kterých je ACLSV řazen. Teoretická část také popisuje geografické rozšíření viru. ACLSV byl detekován v oblastech zaměřených na pěstování ovocných dřevin, jeho rozšíření je téměř celosvětové. V práci jsou shrnuty biologické vlastnosti viru, mezi které řadíme hostitelský okruh viru, příznaky infekce, způsob přenosu a vliv infekce na výnos. ACLSV infikuje především rostliny z čeledi *Rosaceae*, a to jak planě rostoucí, tak pěstované druhy. Typickým příznakem infekce virem jsou chlorotické skvrny na listech, ale u mnoha druhů dřevin probíhá infekce latentní formou. Virus není přenášen na jiné rostliny pomocí pylu, semen ani žádným hmyzím vektorem. V práci jsou také popsány možné způsoby detekce viru a jeho molekulární charakteristika, především podrobnější je popis jednotlivých čtecích rámců ORF. Na závěr jsou uvedeny informace o doposud popsané genetické variabilitě izolátů ACLSV.

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na stanovení celogenomické sekvence izolátů ACLSV získaných ze stromů *Prunus domestica*. Ze získaných PCR segmentů byla složena téměř úplná celogenomická sekvence českého izolátu 158. Fylogenetická analýza jednotlivých čtecích rámců testovaného izolátu potvrdila hostitelskou specifitu izolátu 158, ale také poměrně vysokou variabilitu ACLSV.

## SUMMARY

The bachelor thesis is focused on the molecular characteristics and genetic variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), as the worldwide distributed pathogen of pome and stone fruits.

The theoretical part at first briefly summarizes basic information about ACLSV and characterizes genus *Trichovirus* and family *Betaflexiviridae* into which ACLSV is classified. The theoretical part also describes geographical distribution of the virus. ACLSV was detected in areas involving the cultivation of fruit trees, its distribution is nearly worldwide. It summarizes biological characteristics, such as the host range of the virus, symptoms of infection, mode of transmission and the impact of infection on yield. ACLSV infects especially plants of the family *Rosaceae*, both wild and cultivated species. Typical symptoms of virus infection are chlorotic spots on the leaves but the infection can be symptomless in many tree species. The virus is not transmissible to other plants by pollen, seeds or the insect vector. There are also described possible virus detection methods and the molecular characteristic, especially the description of the particular open reading frames ORF. In conclusion, there are provided information about genetic variability of isolates ACLSV mentioned before.

The experimental part of this thesis is focused on determination of fullgenomic sequence of isolates ACLSV obtained from *Prunus domestica*. Almost complete fullgenomic sequence of the Czech isolate 158 was assembled from obtained PCR segments. Phylogenetic analysis of particular open reading frames of tested isolate confirmed host specificity of ACLSV isolates but also relatively high variability of ACLSV.

Poděkování:

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

Práce byly financovány Interní grantovou agenturou Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2016\_003).

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	9
3	<i>APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT VIRUS</i> .....	10
3.1	Taxonomické zařazení ACLSV .....	10
3.1.1	Charakteristika čeledi <i>Betaflexiviridae</i> .....	10
3.1.2	Charakteristika rodu <i>Trichovirus</i> .....	11
3.2	Geografické rozšíření ACLSV .....	11
3.3	Biologické vlastnosti ACLSV .....	12
3.3.1	Hostitelský okruh.....	12
3.3.2	Příznaky způsobené virem.....	13
3.3.3	Způsob přenosu .....	14
3.3.4	Ovlivnění výnosu po infekci.....	14
3.4	Detekce a diagnostika ACLSV .....	15
3.5	Molekulární a genetická charakteristika ACLSV .....	16
3.6	Genetická variabilita ACLSV .....	18
4	MATERIÁL A METODY .....	21
4.1	Biologický materiál.....	21
4.2	Izolace RNA na oxidu křemičitém (Silica capture).....	21
4.3	RT-PCR .....	22
4.4	Elektroforetická separace.....	24
4.5	Izolace PCR produktů z gelu .....	24
4.6	Sekvencování výsledných produktů .....	25
4.7	Bioinformatická analýza .....	25
4.8	Použité chemikálie, kity, roztoky a jejich složení.....	27
4.8.1	Chemikálie.....	27

4.8.2	Roztoky.....	27
4.8.3	Kity a ostatní chemikálie .....	27
4.9	Použité přístroje .....	28
5	VÝSLEDKY .....	29
6	DISKUZE.....	37
7	ZÁVĚR.....	40
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	41



# 1 ÚVOD

Virová onemocnění ovocných dřevin způsobují velké ekonomické škody v sadech a zahradách. Planě rostoucí i kulturní druhy dřevin mohou být infikovány různými viry, často se jedná o směsné infekce více virů najednou. Problémem těchto infekcí bývá častá latentní forma průběhu, bez viditelných příznaků. Mezi nejčastěji vyvolané symptomy patří celková zakrslost rostlin, chlorotické skvrny, mozaiky a léze na listech a jejich deformace a znehodnocení kvality plodů. Nejlepšími způsoby jak zabránit šíření infekce jsou kontrola hmyzích přenašečů, pěstování méně citlivých odrůd, případně vysazování zdravého výsadbového materiálu, který byl vypěstován a zkontrolován ve speciálních školkách. Mezi nejběžnější viry infikující pěstované druhy ovocných dřevin patří *Plum pox virus*, *Apple stem pitting virus*, *Apple stem grooving virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prune dwarf virus* a *Prunus necrotic ringspot virus*.

U většiny virů vyskytujících se ve více geografických oblastech a u širšího hostitelského spektra je možné pozorovat velkou variabilitu mezi izoláty a korelaci genetické variability izolátů s jejich hostitelským okruhem a geografickým původem.

Tato bakalářská práce je zaměřena na popsání viru chlorotické skvrnitosti jabloní, jeho biologických vlastností, výskytu a genetické variability. Cílem experimentální části je získání parciálních sekvencí ACLSV pro sestavení celogenomické sekvence. Získaná sekvence byla použita pro stanovení genetické variability viru.

## **2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

- Vypracování rešerše na téma „Výskyt ACLSV a jeho genetická variabilita“.
- Detekce a identifikace viru ve vzorcích.
- Sestavení celogenomické sekvence izolátu ACLSV.
- Stanovení genetické variability izolátů ACLSV a sekvencí dostupných v NCBI databázi.

### 3 APPLE CHLOROTIC LEAF SPOT VIRUS

*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), virus chlorotické skvrnitosti jabloní patří do rodu *Trichovirus*, čeledi *Betaflexiviridae*. ACLSV je charakterizován podlouhlými, flexibilními částicemi s příčným pruhováním a helikální strukturou, o rozměrech 720 x 12 nm (viz Obrázek č. 1). Genom se skládá z jedné pozitivně orientované jednovláknové RNA molekuly (Martelli a kol., 1994; Yoshikawa, 2001). ACLSV byl poprvé popsán jako latentní virus u jabloně. Nejprve byl detekován v Anglii u *Malus platycarpa*, ale Luckwill a Campbell (1959) tento virus pojmenovali jako *Platycarpa line pattern virus*. Až Mink a Shay (USA, 1959) tento virus pojmenovali jako *Apple chlorotic leaf spot virus*, poté co pozorovali příznaky infekce ACLSV u podnože ruské jabloně (Németh, 1986). Tento virus řadíme mezi velmi důležité rostlinné patogeny vzhledem k jeho celosvětovému rozšíření a širokému okruhu hostitelů (Katsiani a kol., 2014). Pro tento virus byly používány synonymní názvy, jako např. *Pear ring pattern mosaic virus*, *Quince stunt virus*, *Plum pseudopox virus* a *Apple latent virus type 1* (Malan, 2015).

Obrázek č. 1: Virová částice ACLSV (převzato z Isogai a kol., 2007)



#### 3.1 Taxonomické zařazení ACLSV

##### 3.1.1 Charakteristika čeledi *Betaflexiviridae*

Čeď *Betaflexiviridae* je taxonomicky řazena do řádu *Tymovirales*. Na základě fylogenetické analýzy sekvence RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp) a pláštěvého proteinu byla do této čeledi zařazena skupina rodů *Capilovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* a *Vittivirus*. Dále bylo do této skupiny začleněno 9 do rodů nezařazených druhů: *African oil palm ringspot virus* (AOPRV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), *Banana virus X* (BVX), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry*

*necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Diuris virus A* (DiVA), *Diuris virus B* (DiVB), *Hardenbergia virus A* (HarMV) a *Sugarcane striate mosaic-associated virus* (SCSMaV). Tato čeleď byla vytvořena až v roce 2007 rozdělením původní čeledi *Flexiviridae* na základě podobnosti replikačního proteinu s rodem *Carlavirus*. Pro viry, které patří do této čeledi je charakteristická především pozitivní molekula ssRNA, vláknité částice bez obalu o délce od 610 do 1000 nm a průměru 12-14 nm a fakt, že mohou mít až 6 čtecích rámců. Důležitým znakem je flexibilní tvar částic, podle nějž byla tato čeleď pojmenována (Adams a kol., 2004; Martelli a kol., 2007; ICTV, 2009; ICTV, 2014).

### 3.1.2 Charakteristika rodu *Trichovirus*

Rod *Trichovirus* byl ustanoven a schválen ICTV (International committee on taxonomy of viruses) na 9. mezinárodním kongresu virologie v Glasgow roku 1993 na základě charakterizace viru ACLSV (Martelli a kol., 1994). Do tohoto rodu byl dříve řazen také druh *Potato virus T* (PVT), ten je ale od roku 2011 zařazen do samostatného rodu *Tepovirus*. V současné době do tohoto taxonu patří *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Peach mosaic virus* (PcMV), *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV), *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) a *Phlomis mottle virus* (PhMV). Kritérium pro molekulární vymezení druhů mezi viry z rodu *Trichovirus* je více než 15% variabilita v sekvenci nukleotidů CP genu (Adams a kol., 2004; ICTV, 2014). Viry z rodu *Trichovirus* infikují dvouděložné rostliny a jsou celosvětově rozšířeny. Částice všech druhů jsou spirálovitá flexibilní vlákna o velikosti 640-800 nm a 12 nm v průměru, kdy asi 10 podjednotek připadá na jednu otočku šroubovice o velikosti 3,8 nm (Bar-Joseph a kol., 1974; Martelli a kol., 1994).

## 3.2 Geografické rozšíření ACLSV

Výskyt ACLSV byl potvrzen v mnoha zemích zaměřených na pěstování ovocných jaderovin a peckovin, kde probíhaly rozsáhlé průzkumy na výskyt virových onemocnění. Virus byl detekován v Anglii (Campbell, 1961 cit. dle Keshavarz a Shams-Bakhsh, 2015), USA (Waterworth 1993), České republice (Karešová a Paprštejn, 2001) a Bosně a Hercegovině (Lolic a kol., 2010). Mezi další země, ve kterých byl virus detekován, patří Bulharsko (Borisova a Christov, 2014), Rumunsko (Popescu a kol., 2004), Moldavsko (Verderevskaja

a Marinescu, 1985 cit. dle Keshavarz a Shams-Bakhsh, 2015), Srbsko (Mandic a kol., 2007), Ukrajina (Gadiou a kol., 2010), Polsko (Zawadzka, 2013), Lotyšsko (Pūpola a kol., 2011), Belgie (Gadiou a kol., 2010), ale také Jordáno (Salem a kol., 2005). V některých provinciích Iránu (Teherán, Isfahán, Chorásán a Východní a Západní Ázerbájdžán), kde jsou soustředěny oblasti pěstování ovocných jaderovin, byl realizován průzkum výskytu ACLSV se zaměřením na jabloně (*Malus pumila*), hrušně (*Pyrus communis*) a kdouloně (*Cydonia oblonga*). Virus byl v Iránu detekován pouze u jabloní, což ovšem nemusí znamenat, že se virus v této oblasti nevyskytuje u ostatních ovocných dřevin (Keshavarz a Shams-Bakhsh, 2015). V průběhu jara 2003 a 2004 byly testovány jaderoviny v některých oblastech Sýrie. Výsledky ukázaly míru infekce u jabloní 34 % a u hrušní 2 % (Ismaeil a kol., 2006). Výzkumy zaměřené na výskyt ACLSV byly provedeny i v zemích kolem Středoziemního moře, kde byl virus detekován v Albánii, Alžírsku, Chorvatsku, Egyptě, Francii, Maroku, Řecku, Itálii, Libanonu, Palestině, Španělsku, Turecku, Tunisku a na Maltě a Kypru, a to jak u jaderovin, tak u peckovin (Myrta a kol., 2003; Çağlayan a kol., 2006; Afechtal a kol., 2010; Mahfoudhi a kol., 2013). Jako součást směsných infekcí byl virus detekován také v Austrálii, a to především u *Malus domestica*, a také na Novém Zélandu (Wood, 1974; Constable a kol., 2007). Rana a kol. (2007a, 2007b, 2008) v Indii potvrdili výskyt ACLSV u mandloní, broskvoní a meruněk. V Číně, která je největším producentem jablek na světě, byl virus detekován poprvé Liu a Wangem (1989). Na Tchaj-wanu byl virus detekován u hrušní (Jan a kol., 2003). V neposlední řadě byl virus detekován také v Japonsku (Yanase, 1974), Korei (Cho a kol., 2012) a Brazílii (Fajardo a Nickel, 2014). Pravděpodobně se tedy virus vyskytuje ve všech oblastech, ve kterých se kulturně pěstují ovocné druhy čeledi *Rosaceae* (Yoshikawa, 2001).

### **3.3 Biologické vlastnosti ACLSV**

#### **3.3.1 Hostitelský okruh**

Mezi běžné hostitele ACLSV můžeme řadit jak divoké, tak okrasné i pěstované druhy ovocných stromů z čeledi *Rosaceae*. Je známo, že infikuje nejvíce jaderoviny a peckoviny, dřeviny i keře (Lister, 1970; Németh, 1986). Katsiani a kol. (2014) ve své práci rozšířili poznatky o okruhu přirozených hostitelů ACLSV testováním zástupců čeledi *Rosaceae*, se zvláštním zaměřením na okrasné a planě rostoucí stromy a keře, které by mohly představovat neznámé přírodní rezervoáry viru. Virus byl zjištěn u jabloní (*Malus domestica*), kdouloní (*Cydonia oblonga*), hrušní (*Pyrus communis*), třešňi (*Prunus avium*), višňi (*Prunus*

*cerasus*), mandloní (*Prunus dulcis*), broskvoní (*Prunus persica*), meruňky (*Prunus armeniaca*), jeřábu (*Sorbus aucuparia*), *Pyrus amygdaliformis* a *Camellia japonica*. V Řecku byl virus detekován také u dalších druhů, a to u *Prunus domestica* (slivoň švestka), *Crataegus nigra* (hloh černý), *Crataegus monogyna* (hloh jednosemenný), *Prunus spinosa* (trnka obecná) a *Prunus cerasifera* (slivoň myrobalán). Dále byl detekován také u růže (*Rosa canina*), divokých druhů *Rubus* sp. a *Potentilla pindicola*, které mohou představovat již zmíněné přirozené hostitele. Výskyt ACLSV u hrušní pěstovaných v Číně byl podle výzkumů stanoven až u 80 % stromů (Wang a kol. 1994). V Indii byli testováni také planě rostoucí druhy rodu *Prunus*, tedy divoké meruňky a divoké himálajské třešně, které se běžně používají jako podnože pro pěstované druhy. U některých izolátů ACLSV bylo zjištěno, že nevykazují hostitelskou specifitu, čímž jsou umožněny křížové infekce („cross-infection“) z peckovin na jádroviny a opačně (Rana a kol., 2010; Malan, 2015).

### 3.3.2 Příznaky způsobené virem

ACLSV vyvolává deformace listů a redukuje jejich velikost, a také hmotnost plodů. Dalšími symptomy jsou chlorotické skvrny na listech nebo prstencová mozaika na listech u vnímavých kultivarů jabloní a hrušní. Na plodech jabloní se často objevují typické hnědé prstencovité skvrny, které připomínají otlaky. U některých odrůd se můžeme setkat s bezpříznakovou formou infekce, ale u citlivých druhů se vždy projevuje různorodou malformací a chlorotickými kroužky nebo pásy. Některé virulentní izoláty mohou rovněž vyvolávat příznaky onemocnění „plum bark split“ na kmenech švestek. U broskvoní se často setkáváme s tmavě zelenými propadlými skvrnami a vlnovkami na listech a mramorováním a důlky na plodech (Németh, 1986; Yoshikawa, 2001; Malan, 2015). Příznaky ACLSV mohou být často podobné onemocnění šarky švestky („false sharka“, „false plum pox“) nebo u meruňek jako „butteratura“. Závažnost symptomů vyvolaných ACLSV do značné míry souvisí s druhem infikované rostliny, a také s kmenem či konkrétním izolátem viru. Poškození mívá větší rozsah u trvalých rostlin než u jednoletých rostlin. U některých podnoží se v důsledku infekce ACLSV může při roubování objevit inkompatibilita vůči roubovům (Németh, 1986; Malan, 2015).

### 3.3.3 Způsob přenosu

Doposud nebyl prokázán žádný přirozený hmyzí vektor, kterým by byl virus přenášen. Žádné doposud získané výsledky neukázaly na to, že by byl virus přenášen na jakéhokoliv hostitele pomocí semen nebo pylu (García-Ibarra a kol., 2010; Yoshikawa, 2001). Ukázalo se tedy, že virus je rozšiřován především vegetativně, tj. používáním infikovaných roubů, oček a podnoží pro množení (Lister, 1970; Németh, 1986). Pro kontrolu šíření viru je důležitá znalost okruhu možných hostitelů, genetické rozmanitosti izolátů, ale také úplné pochopení mechanismu přenosu viru, aby se předcházelo šíření viru očkováním a roubováním (Isogai a kol., 2007). Monitoring výskytu ACLSV u ovocných stromů jaderovin i peckovin je podmínkou pro kontrolu viru. Používání zdravého rostlinného materiálu je nezbytné pro zabránění šíření viru ve výsadbách ovocných dřevin, a také pro snížení nákladů na produkci ovoce (Wang a kol., 2011).

### 3.3.4 Ovlivnění výnosu po infekci

ACLSV způsobuje velké ztráty na výnosech řady ovocných stromů. V komerčních jabloňových sadech míra infekce ACLSV dosahuje 80-100 %, což má za následek ztrátu na výnosu přibližně 30-40 % (Cembali a kol., 2003). V mnoha zemích byly realizovány certifikační programy s cílem zabezpečit produkci viruprostých rozmnožovacích materiálů (Massart a kol., 2008). V rámci Evropy funguje Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin (EPPO), která vydává předpisy a certifikační schémata jako informace pro výrobu množitelského materiálu. Certifikované rostliny bývají pěstované ve speciálních ovocných školkách, ve kterých se dohlíží na správné podmínky pěstování a zabránění infekce.

Neexistuje žádný dostupný způsob jak uzdravit vysazené nakažené stromy, a proto je potřeba množit zdravý rostlinný materiál. Proto bylo mnoho výzkumů zaměřeno na eliminaci viru v nakažených rostlinách pomocí teplotní terapie a chemoterapie *in vitro*. Byla ovšem nutná optimalizace podmínek vzhledem k systému virus-hostitel, případně kombinace virů. Dále byla zkoumána možnost kombinace s meristemovými kulturami. Účinnost eliminace viru závisí na zvolení správného období pro termoterapii, správné teplotě a velikosti meristémů. ACLSV je velmi citlivý na vysoké teploty, a proto se pro ozdravování rostlin používají teploty 34-39 °C. Při chemoterapii se využívá antivirotika ribavirinu (EPPO, 2001; Wang a kol., 2006; Ciešlínska, 2007; Svoboda a Polák, 2010; Malan, 2015).

Svoboda a Polák (2010) zjistili, že v České republice je nakaženo ACLSV téměř 95 % jabloní. Oproti tomu u švestek a slivoní se výskyt pohybuje pouze kolem 1 %. Ve většině případů se jedná o tzv. směsné infekce, kdy dochází k infekci dvou nebo více virů najednou. V případě České republiky jsou jádroviny infikovány obvykle třemi až čtyřmi latentními viry. ACLSV se nejčastěji vyskytuje v kombinaci s virem mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*), virem mělké vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*) a virem žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*). Tyto směsné infekce jsou vysoce škodlivé, protože vyvolávají silnější příznaky než virus samotný. Podle zahraničních údajů způsobují ztrátu na výnosu a kvalitě až 40 % (Polák, 2007; Jarošová a kol., 2008; Svoboda a Polák, 2010).

### **3.4 Detekce a diagnostika ACLSV**

U řady pěstovaných ovocných druhů se napadení virem neprojevuje žádnými příznaky, protože infekce probíhá často latentní formou. Z tohoto důvodu je potřeba využívat přesné a citlivé metody pro diagnostiku viru. Mezi tyto metody jsou běžně řazeny DAS-ELISA a RT-PCR, které jsou hojně využívány pro detekci ACLSV. Problémem pro obě zmíněné metody je nerovnoměrné rozšíření viru v jednotlivých částech infikovaných rostlin. Pro testování je ze stromů odebírán průměrný vzorek, ze kterého se pro zmíněné metody využívá pouze malé množství v miligramech. Tím vzniká možnost získání falešných negativních výsledků (Svoboda a Polák, 2006).

ELISA testování, z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, je sice levné, jednoduché, velmi rychlé a použitelné pro velké množství vzorků, ale problémem jsou velmi nízké koncentrace viru v rostlině, které mohou být pod detekčním limitem používané metody (Detienne a kol., 1981). ELISA test umožňuje testování těch virů napadajících ovocné peckoviny a jádroviny, pro které existují dostupné polyklonální nebo monoklonální protilátky (EPPO 1999). Nevýhodou DAS-ELISA metody oproti RT-PCR amplifikaci pro diagnostiku ACLSV je její nižší citlivost. Opakovaně se potvrdilo, že pro odběr testovaných vzorků z různých jádrovin a peckovin je důležitý výběr vhodného období, aby byly výsledky testů spolehlivé. Jako nejspolehlivější období byla stanovena první polovina roku, především jarní sezóna, kdy se odebírají vzorky z kvetoucích stromů. V tomto období intenzivního růstu se odebírají vzorky mladých listů a okvětní plátky (Svoboda a Polák, 2010).



Jeví se, že nejlepší alternativou je metoda RT-PCR, tedy reverzní transkripce následovaná polymerázovou řetězovou reakcí, která poskytuje vyšší citlivost vůči ELISA testu a může být efektivně použita pro zpracování většího počtu vzorků. Pro detekci ACLSV je možné využít různé varianty a modifikace PCR, jako například duplex RT-qPCR nebo multiplex RT-PCR. Multiplex RT-PCR metoda umožňuje během jedné reakce amplifikovat více cílových úseků, tudíž je možné detekovat více virů současně (Jarošová a kol., 2008; Zhao a kol., 2013). Sekvence izolátů ACLSV jsou vzájemně velmi variabilní, a proto se pro specifickou detekci ACLSV RT-PCR metodou využívá velké množství různých párů primerů (Menzel a kol., 2002; Spiegel a kol., 2006; Mathioudakis a kol., 2010).

Dále můžeme přítomnost viru detekovat pomocí dřevinných a bylinných indikátorů. Tato metoda je ovšem velmi nákladná, protože je nutné pěstování indikátorových rostlin provádět ve sklenících s kontrolovanou teplotou. Využití je časově náročné oproti DAS-ELISA testu a RT-PCR, jelikož výsledky jsou získávány až po době minimálně dvou let a déle. Nevýhodou je také obtížnější interpretace získaných výsledků, protože příznaky na indikátorech nemusí být průkazné pro rozlišení, o který virus se jedná a jsou tedy velmi zavádějící (Svoboda a Polák, 2010). Jako indikátory se nejčastěji používají rostliny, u kterých byl zjištěn výskyt příznaků odpovídajících danému viru. Nejtypičtějším a nejvíce využívaným indikátorem pro ACLSV je merlík čilský (*Chenopodium quinoa*), dalšími bylinnými indikátory jsou *Chenopodium amaranticolor* nebo *Nicotiana occidentalis*. Dřevinné indikátory jsou často voleny podle místa pěstování (skleník, pole). Mezi ně řadíme různé odrůdy *Malus sylvestris*, *Pyronia veitchii*, *Cydonia oblonga* a *Malus platycarpa* (EPPO, 1999; EPPO, 2001).

### **3.5 Molekulární a genetická charakteristika ACLSV**

Úplná sekvence byla prozatím stanovena u 10 izolátů ACLSV; ze švestky (izoláty P863 a PBM1) (German a kol., 1990; Jelkmann, 1996), jabloně (izoláty P-205, A4, B6 a MO-5) (Sato a kol., 1993; Yaegashi a kol., 2007), třešně (izolát Bal1) (German-Retana a kol., 1997) a broskvoně (izoláty TaTao5, Z1, a Z3) (Marini a kol., 2008; Niu a kol., 2012).

Genom ACLSV se skládá ze 7474-7561 nukleotidů, kdy 5' a 3' nekódující oblasti jsou dlouhé 150 a 168 nukleotidů. Genom zahrnuje tři překrývající se otevřené čtecí rámce (ORFs) (viz Obrázek č. 2). Všechny čtecí rámce začínají start kodonem AUG a končí stop kodonem UGA.

ORF 1 kóduje dlouhý polyprotein o velikosti 216 kDa, který se podílí na replikaci genomu, ORF 2 (5716-7358 nt) kóduje 50 kDa velký protein zajišťující pohyb („movement“ protein) a ORF 3 kóduje plášťový protein s molekulovou hmotností 21 kDa (Yoshikawa a Takahashi, 1988; Martelli a kol., 1994). Tento protein se u ACLSV podílí na replikaci, modulaci symptomů, pohybu z buňky do buňky, systémovém šíření, potlačení RNA „umlčování“ a tvorbě virionu (Callaway a kol., 2001).

Gen virové replikázy, který se nachází v oblasti 150-5798 nt (ORF1), má 4 hlavní domény, a to methyl transferázovou, peptidázovou, doménu virové helikázy a RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp). Methyl transferáza, která se nachází v oblasti N' konce na pozici 59-233, se podílí na tvorbě 5' čepičky („cap“) na 5' konci virové mRNA. Helikáza hraje velkou roli při replikaci RNA viru, stejně jako RNA polymeráza. Mezi methyl-transferázovou a peptidázovou doménou se nachází hyper variabilní oblast (German-Retana a kol., 1997; Dhir a kol., 2013). Byl identifikován konzervovaný hexanukleotidový motiv UUAGGU začínající na pozici 5565, tedy 145 nukleotidů před genem kódujícím „movement“ protein, a na pozici 6593, která se nachází 177 nukleotidů před genom pro plášťový protein. Tento motiv je počátečním místem transkripce pro obě subgenomové RNA (Komatsu a kol., 2012).

MP protein (ORF2) slouží k pohybu z buňky do buňky („cell-to-cell movement“), a tím pádem i k rozšíření infekce po rostlině, pomocí plasmodesmat. Pohyb přes plasmodesmata byl prokázán pomocí elektronové mikroskopie a značení zeleným fluorescenčním proteinem GFP, který fúzuje s MP proteinem. Fúze s GFP proteinem ukázala, že MP protein je spojený s mikrotubuly a endoplazmatickým retikulem, které jsou zapojeny do přesunu MP proteinu z místa syntézy v cytoplasmě k plasmodesmatům. Stejně jako většina virových MP proteinů i tento byl na základě porovnání sekvencí přiřazen ke skupině „30 K“ nadčeledi, a to díky přítomnosti konzervativního motivu v aminokyselinové sekvenci, tzv. „D motivu“. Označení „30 K“ skupiny se vztahuje k MP *Tobacco mosaic virus* o velikosti 30 kDa. Dále bylo prokázáno, že MP protein se v infikovaných tkáních nachází fosforylovaný. Tato postranslační modifikace je dalším společným znakem pro většinu virových „movement“ proteinů (German a kol., 1990; Melcher, 1990; Mushegian a Koonin, 1993; Sato a kol., 1995; Melcher, 2000; Satoh a kol., 2000; Isogai a kol., 2007).

Obrázek č. 2: Schéma organizace genomu ACLSV (převzato z Adams a kol., 2004)



Mt - methyl transferáza, Hel - helikáza, Pol - RNA-dependentní RNA polymeráza, MP - „movement“ protein, CP - plášťový protein

Dřívější analýzy aminokyselinového složení proteinů naznačují relativně nízký obsah aromatických aminokyselin. Pomocí elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že na jednu otáčku šroubovice RNA připadá zhruba 10 podjednotek. Tato hodnota byla specifikovaná na 9,3 až 9,8 podjednotek na základě délky celé částice (720 nm) a délky jednoho závitu šroubovice, tedy 3,8 nm. Z těchto dvou hodnot bylo stanoveno, že na celou částici připadá asi 190 otáček primární šroubovice (Bar-Joseph a kol., 1974).

### 3.6 Genetická variabilita ACLSV

Vysoká genetická variabilita je typická pro viry jako výsledek strategie potřeby přežít v hostiteli. Tato rozmanitost umožňuje virům přizpůsobit se podmínkám prostředí. Výsledkem toho vznikají tzv. „quasispecies“, tedy velké množství geneticky rozmanitých variant stejného viru, které vznikly mutací (Lauring a Andino, 2010). Pomocí serologických a molekulárních metod byla prokázána výrazná variabilita mezi ACLSV izoláty z různých zdrojů. Molekulární charakteristika izolátů velmi souvisí s původními hostiteli. Bylo zjištěno, že genom *Apple chlorotic leaf spot virus* vykazuje vysokou variabilitu mezi jednotlivými izoláty pocházejícími z Itálie, Francie, Polska, Německa a Maďarska, kdy se může lišit od 10 do 20 % v sekvenci nukleotidů. Studie izolátů pocházejících ze středomořských zemí (Albánie, Jordánsko, Libanon, Turecko a Španělsko), Číny, Egypta, Indie a Japonska, poukázaly na variabilitu v oblasti CP genu. Molekulární charakteristiky byly získány z hrušky písečné (*Pyrus pyrifolia*) z Číny a evropské hrušky (*Pyrus communis*) z Itálie a Indie (Al Rwahnih a kol., 2004; Farrag a kol., 2005; Cai a kol., 2005; Yaegashi a kol., 2007; Zheng a kol., 2007; Rana a kol., 2010; Song a kol., 2011).

Rozdílnost mezi izoláty z různých hostitelů je dána variabilitou u tří hlavních oblastí. První oblastí je vysoce proměnlivý segment na pozici 602-672 nt za doménou methyl-transferázy ve čtecím rámci ORF1, který mezi izoláty vykazuje identitu pouze kolem 20 %. Dalšími

zónami variability jsou C' koncová část čtecího rámce ORF2, u které je variabilita nerovnoměrně rozložená a u které byly prokázány pouze malé konzervované oblasti, a N' koncová část čtecího rámce ORF3 (German-Retana a kol., 1997). Mezi různými izoláty byla prokázána velká genetická variabilita v rámci čtecího rámce ORF1 (Dhir a kol., 2013). Další studie byly zaměřeny především na charakterizaci CP genu, kdy bylo zjištěno, že C' terminální část pláštěvého proteinu ACLSV je relativně konzervovaná, ale N' terminální oblast, částečně překrývající se s MP oblastí, vykazuje vysokou variabilitu (Candresse a kol., 1995; Yaegashi a kol., 2007). Rana a kol. (2010), potvrdili, že mezidruhová variabilita v sekvenci aminokyselin je v rámci 5' koncové části genu kódujícího pláštěvý protein, zatímco 3' konec je významně méně variabilní. Řada izolátů ACLSV z různých zemí vykazuje alespoň 91% sekvenční homologii aminokyselin, což by naznačovalo, že diverzita části sekvence CP genu mezi izoláty z ovocných jader je nízká (Al Rwahnih a kol., 2004; Rana a kol., 2010).

Na základě záměn pěti aminokyselin v pozicích 40, 59, 75, 130 a 184 byla vytvořena klasifikace ACLSV izolátů z hostitelů kultivovaných druhů v rámci CP oblasti, kdy jsou rozlišovány dvě vysoce konzervativní skupiny. První klastr označovaný jako typ P205 obsahuje kombinaci aminokyselin Ala<sup>40</sup>, Val<sup>59</sup>, Phe<sup>75</sup>, Ser<sup>130</sup> a Met<sup>184</sup>, zatímco izoláty obsahující Ser<sup>40</sup>, Leu<sup>59</sup>, Tyr<sup>75</sup>, Thr<sup>130</sup> a Leu<sup>184</sup> byly zařazeny do druhého klastru typu B6. Kombinace aminokyselin na pozicích 40 a 75, tedy Ala<sup>40</sup> a Phe<sup>75</sup> nebo Ser<sup>40</sup> a Tyr<sup>75</sup>, hraje důležitou roli při účinné replikaci viru v hostitelských buňkách. Izoláty v rámci klastru B6, tedy ty, které mají na pozicích 40 a 75 kombinaci serin a tyrosin, jsou méně infekční. Naopak kombinace aminokyselin na pozicích 59, 130 a 184 nemá přímý vliv na infekci nebo závažnost symptomů. Jelikož aminokyselina na pozici 40 u CP je v oblasti překrývající se s čtecím rámcem ORF2, tak mutace v této pozici má za následek změnu aminokyseliny na pozici 392 u MP. V tomto případě nemá tato záměna vliv na známé funkce „movement“ proteinu, protože C' koncová oblast tyto funkce nepodmiňuje. Dalším zajímavým poznatkem je, že aminokyselina na pozici 59 má vliv na rychlost pohybu virové částice během elektroforetické separace (Yaegashi a kol., 2007; Rana a kol., 2010).

Jednou z neznámých je dodnes znalost genetické diverzity viru z okrasných a divokých druhů hostitelů a evoluční vztahy mezi těmito izoláty a izoláty z pěstovaných ovocných druhů (Al Rwahnih a kol., 2004). Katsiani a kol. (2014) ve své studii stanovili sekvenci velké části CP genu a nepřekládané oblasti 3' konce (3'UTR) izolátů z okrasných a planě rostoucích

druhů, a tyto sekvence použili pro srovnání s kulturními druhy. Výsledky byly použity pro fylogenetické analýzy a získání dalších pohledů na faktory ovlivňující evoluční historii a epidemiologii ACLSV. Fylogenetické stromy, které jsou podobné lidským rodokmenům s uvedenými předky a vzájemnými vztahy, byly sestavovány pro izoláty ACLSV získané z různých druhů a různých geografických oblastí. Tyto fylogenetické analýzy ukázaly časté sdružování do klastrů podle geografického rozšíření nebo původního hostitele (Malan, 2015).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

V rámci bakalářské práce bylo pracováno se 4 vzorky listů získaných ze stromů z rodu *Prunus domestica*. Listy byly odebrány v katastru oblasti obce Šumice a NP Podyjí (19. 9. 2014) (Šimková, 2015). Seznam použitých vzorků je uveden v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Seznam použitých vzorků

Označení vzorku	Lokalita sběru	Druh hostitelského stromu
153	Šumice	<i>Prunus domestica</i>
154	Šumice	<i>Prunus domestica</i>
155	Šumice	<i>Prunus domestica</i>
158	NP Podyjí	<i>Prunus domestica</i>

### 4.2 Izolace RNA na oxidu křemičitém (Silica capture)

Celková RNA byla izolována pomocí modifikované metody Silica capture podle Ciešlińska (2004). Vzorky listů byly homogenizovány pomocí homogenizátoru FastPrep-24 (rychlost 5 m/s) po dobu 60 s v pufru PBS-TPO v poměru 1:20, tj. např. k 0,3 g přidat 6 ml PBS-TPO, a následně centrifugovány po dobu 2 min při 12 000 rpm.

Do 1,5ml mikrozkušavek byly připraveny suspenze smícháním 900 µl pufru L6 a 40 µl připravené suspenze oxidu křemičitého, které byly následně vortexovány a ponechány stát pod dobu 10 min při pokojové teplotě. Do zkumavek bylo přidáno 50 µl centrifugovaného extraktu a opět bylo vortexováno. Zbytek odebraného extraktu po centrifugaci byl uchován při -70 °C. Zkušavky se suspenzí extraktu, oxidu křemičitého a pufru L6 byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 10 min, a poté byly vortexovány a centrifugovány po dobu 16 s při 12 000 rpm. Pomocí vodní vývěvy byl opatrně odstraněn supernatant, tak aby nedošlo k nasání částic oxidu křemičitého. K sedimentu ve zkumavce bylo přidáno 900 µl pufru L2 a poté byly zkumavky vortexovány a centrifugovány po dobu 16 s při 12 000 rpm. Supernatant byl odsát pomocí vodní vývěvy a bylo opakováno promytí pufrům L2. Usazenina

byla promyta 900  $\mu$ l 70% vychlazeného ethanolu. Zkumavky byly vortexovány a centrifugovány po dobu 16 s při 12 000 rpm, následně bylo zopakováno promytí etanolem. Poté byl sediment promyt 900  $\mu$ l acetonu. Zkumavky byly opětovně vortexovány a centrifugovány při 12 000 rpm po dobu 16 s. Pomocí vodní vývěvy byl opatrně odstraněn supernatant. Otevřené zkumavky byly umístěny do termobloku na dobu cca 5 min při 56 °C pro vysušení usazeného peletu. Pro uvolnění nukleových kyselin bylo přidáno 50  $\mu$ l sterilní deionizované vody, poté byly zkumavky vortexovány a uzavřené byly inkubovány v termobloku po dobu 10 min. Nakonec byly vortexovány a centrifugovány po dobu 16 s při 12 000 rpm. Vodní fáze byla pomocí pipety převedena do nových popsaných 1,5ml mikrozkmavek, tak aby nedošlo k porušení peletu. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop ND-1000.

### 4.3 RT-PCR

Pro stanovení celogenomické sekvence byla použita metoda RT-PCR amplifikace 6 překrývajících se genomických segmentů (Niu a kol., 2012) pomocí MyTaq One-Step RT-PCR kitu. Nejprve byla do 1,5ml mikrozkmavky připravena reakční směs ve složení jednotlivých složek (Bioline): 10  $\mu$ l MyTaq One-Step Mix, 1  $\mu$ l RiboSafe RNase Inhibitor (10U/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l Reverse transcriptase, 0,4  $\mu$ l 'forward' (F) primeru (20 pmol/ $\mu$ l), 0,4  $\mu$ l 'reverse' (R) primeru (20 pmol/ $\mu$ l) a 5,7  $\mu$ l deionizované vody. Celkové množství dílčích komponent bylo upraveno s ohledem na množství analyzovaných vzorků. Příprava směsi i pipetování vzorků probíhalo v laminárním boxu za sterilních podmínek. Zkumavky s jednotlivými reagensy a vzorky RNA byly drženy na ledu.

Připravená RT-PCR reakční směs byla po 18  $\mu$ l rozpipetována do 0,2ml PCR zkumavek. K reakční směsi bylo přidáno 2  $\mu$ l izolované RNA, čímž vznikl celkový objem reakce 20  $\mu$ l a následně byly zkumavky vloženy do termocyklu. PCR reakce proběhla za podmínek uvedených v Tabulce č. 2.

Pro detekci ACLSV byly použity kombinace primerů převzaté z Niu a kol. (2012), uvedené v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 2: Obecné podmínky RT-PCR reakce pro detekci ACLSV

Fáze	Čas	Teplota (°C)	Počet cyklů
Reverzní transkripce	40 min	45	1x
Počáteční denaturace	1 min	95	1x
Denaturace	10 s	95	35x
Hybridizace primerů (Annealing)	10 s	44-52	
Prodlužování primerů (Extension)	30 s	72	
Finální „extension“	10 min	72	1x

Tabulka č. 3: Sekvence primerů použitých pro detekci ACLSV

Označení	Sekvence (5' --- 3')	'Annealing' teplota (°C)
ACLSV F1	TGATACTGATACAGTGTACACTCACG	52
ACLSV R1	TTGTCAAAGAACCAATCCTTCATGC	
ACLSV F2	AAGAAACCTGATGTACAATC	44
ACLSV R2	CTTTTGGTAACCTGCAGGCAT	
ACLSV F3	AATGAGGAGTGTTATGACGATGA	47
ACLSV R3	ATCGAACTTTGTTCATCTAT	
ACLSV F4	TACTTTTGTCTTAAGGATG	48
ACLSV R4	TGTCGTCCCAACCAAAATG	
ACLSV F5	TACCGGATAATTACTACATT	47
ACLSV R5	TGCATCAATTGATATGGACAGT	
ACLSV F6	TTCGTTTTCAAGGTCATGCC	50
ACLSV R6	TTGATGTTCTGGGTCCGAAG	



#### **4.4 Elektroforetická separace**

Produkty RT-PCR reakce byly vyhodnoceny pomocí elektroforetické separace na 1% agarózovém gelu. Z rozvařeného roztoku agarózy/TAE bylo odlito 50 ml do připravené kádinky a po mírném zchladnutí byly přidány 3  $\mu$ l fluorescenčního barviva GoodView (GoodView<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain) a roztok byl promíchán. Připravený gel byl nalit do elektroforetické vaničky s vloženým hřebínkem a ponechán tuhnout po dobu 45 až 60 min při pokojové teplotě. Poté byl gel přelit pracovním roztokem 1x TAE pufru po rysku a byly vyjmuty hřebínky.

Do první jamky byly napipetovány 2  $\mu$ l standardu molekulární hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), do dalších jamek bylo pipetováno po 5  $\mu$ l jednotlivých PCR produktů, které byly již smíchány s 2  $\mu$ l roztoku 0,1% bromfenolové modři.

Elektroforetická komora byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu při napětí 80 V na dobu 45 min, při které docházelo k separaci DNA. Poté byl zdroj odpojen a gel byl vyjmut z elektroforetické komory. Separované PCR produkty byly vizualizovány a dokumentovány pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene.

#### **4.5 Izolace PCR produktů z gelu**

Izolace produktů byla provedena pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit, podle postupu QIAquick Spin Handbook 07/2002, QIAGEN.

Nejprve byl připraven 1% agarózový gel, 75 ml tohoto gelu bylo smícháno s 5  $\mu$ l 1% roztoku ethidium bromidu a nalito do připravené elektroforetické vaničky s vloženými hřebínky. Po ztuhnutí gelu byl nalit 1xTAE pufr po rysku a vyjmuty hřebínky. Do první jamky byly napipetovány 2  $\mu$ l standardu molekulární hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) a do dalších jamek byly nanесeny celé objemy PCR produktů smíchané s 3  $\mu$ l 0,1% bromfenolové modři. Elektroforetická separace probíhala po dobu 45 min při 80 V.

Gel byl po separaci vyjmut z elektroforetické komory a vizualizován při 365 nm na UV transluminátoru, určenému k vyřezávání z gelu. Pomocí sterilních jednorázových skalpelů byly vyřezávány jednotlivé PCR produkty, které byly vloženy do příslušných označených

1,5ml mikrozkušavek. Na každý vzorek byl použit nový skalpel pro zabránění kontaminace. Zvážením zkumavek s gelem a odečtením váhy prázdné zkumavky byla zjištěna váha vyříznutého gelu. Podle zjištěných hodnot byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1, tj. při navážce 100 µg gelu přidat 300 µl pufru. Zkumavky byly inkubovány po dobu 10 min při 50 °C v dry-bloku, dokud nebyl gel úplně rozpuštěn. Byl přidán 1 objem izopropanolu, tj. při navážce 100 µg gelu přidat 100 µl izopropanolu. Poté byly nachystány kolonky pro izolaci DNA (fialové kolonky vložené do sběrných zkumavek), do kterých byly napipetovány směsi z příslušných zkumavek. Kolonky byly centrifugovány po dobu 1 min při 13 000 rpm. Ze sběrných zkumavek bylo vylito, co proteklo a do kolonek bylo přidáno 500 µl QG pufru. Kolonky byly opět centrifugovány při 13 000 rpm a následně bylo vylito, co proteklo. Bylo přidáno 750 µl PE pufru a opět následoval krok centrifugace, vylití a centrifugace. Kolonky byly umístěny do nových 1,5ml mikrozkušavek a na střed kolonek bylo pipetováno 30 µl destilované vody. Zkumavky byly centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 1 min. Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí fluorimetru Hoefer DyNa Quant 200. Izolovaná DNA byla dlouhodobě uchovávána v -20 °C.

#### **4.6 Sekvencování výsledných produktů**

Izolované PCR produkty odpovídající jednotlivým genomickým fragmentům byly zaklonovány do plazmidů pGEM-T a následně transformovány do bakterií *E.coli* kmene DH5α. Z každého klonovaného vzorku byly vybrány 3 pozitivní transformované kolonie, kromě fragmentu 4, u kterého byly vybrány 4 kolonie. Tyto klony byly použity pro PCR amplifikaci s použitím primerů M13F a M13R a sekvenování. Sekvenační značení bylo provedeno pomocí komerčního kitu Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) dle pokynů výrobce a vlastní sekvenování bylo provedeno pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB, AV ČR, Olomouc. Tento postup byl proveden pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů.

#### **4.7 Bioinformatická analýza**

Pro sestavení celogenomické sekvence byly použity pouze sekvence získané u vzorku 158 a jako referenční genom byl zvolen genom z *P. domestica* (NC\_001409.1). Výstupy získané po sekvenování jednotlivých zaklonovaných PCR produktů byly sestaveny do výsledných

kontigů pomocí programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.). Porovnáním sestavených kontigů s referenčním genomem v programu ClustalW v MEGA6 byla určena jejich vzájemná podobnost. Sekvence vykazující největší shodu s referenčním genomem byly použity pro složení celogenomické sekvence. Sekvence testovaného izolátu byla pomocí mnohočetného alignmentu v programu ClustalW v MEGA6 porovnána se sekvencemi ACLSV genomu dostupnými v databázi GenBank, poté byly sekvence zarovnány do bloku. Bylo zjištěno, které části čtecích rámců byly získány a jejich podobnost se sekvencemi v databázi GenBank byla zjištěna využitím programu BLAST. V rámci jednotlivých čtecích rámců ACLSV byla provedena fylogenetická analýza neighbor-joining metodou v programu MEGA6. Výsledné fylogenetické stromy byly vizualizovány v programu Tree Explorer (MEGA6).

## 4.8 Použité chemikálie, kity, roztoky a jejich složení

### 4.8.1 Chemikálie

Aceton

Agarose I<sup>TM</sup> Biotechnology Grade (Ambresco)

Destilované voda a sterilní deionizovaná voda

Izopropanol

### 4.8.2 Roztoky

0,1 M Tris/Cl: 2,42 g Tris, 160 ml H<sub>2</sub>O, pH 6,4, doplnit vodou na objem 200 ml

0,1% roztok bromfenolové modři v 30% glycerínu

1% roztok ethidium bromidu ve vodě

1x TAE pufr

70% ethanol

L2 pufr: 60 g guanidin thiokyanát, 50 ml 0,1M Tris, pH 6,4

L6 pufr: 30 g guanidin thiokyanát, 25 ml 0,1M Tris, 5,5 ml 0,2M EDTA, 0,65 g Triton X-100

Oxid křemičitý (SC): 60 g oxidu křemičitého (Sigma S5631), 0,5 l H<sub>2</sub>O, nechat stát přes noc, po 24 hod odstranit 430 ml tekuté části nad sedimentem, doplnit vodou na 500 ml a protřepat, nechat 5 hod sedimentovat, odstranit 440 ml tekuté části, zbytek promíchat s oxidem křemičitým, přidat pár kapek 32% HCl, pro ustálení pH 2, rozdělit do zkumavek a autoklávovat

PBS: 800 ml H<sub>2</sub>O, 8 g NaCl, 7,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, pH 7,4, doplnit vodou na objem 1000 ml

PBS-T: 100 ml PBS, 0,5 ml 10% roztoku Tween-20

PBS-TPO (pufr pro homogenizaci): 2 g PVP-40, 0,2 g vaječného albuminu nebo 0,5 g hovězího sérového albuminu, přilít malé množství PBS-T, doplnit do 100 ml roztokem PBS-T

### 4.8.3 Kity a ostatní chemikálie

GeneRuler<sup>TM</sup> 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

GoodView<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain

MyTaq One-Step RT-PCR Kit (Bioline)

Primery ACLSV F1-F6, R1-R6 (Generi Biotech)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

## 4.9 Použité přístroje

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

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)

Fluorimetr Hoefer DyNa Quant 200 (Amershan Biosciensis)

Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Mikrovlnná trouba MA 85050 (OTF)

Minicentrifuga Spectrafuge<sup>TM</sup> MINI (Labnet)

Minicentrifuga Prism<sup>TM</sup> Mini Centrifuge (Labnet)

NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Přístroj na tvorbu ledu Icematic F100, Compact Ice flakem (Gemini FV)

Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)

Termocycler T100<sup>TM</sup> (BIO-RED)

Termocycler T-Personal (Biometra)

Termocycler T-Gradient (Biometra)

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

UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)

Vakuová pumpa XF54 230 50 (Millipore)

Vortex MS2 Minishaker (IKA)

Zdroj stejnosměrného proudu Power Station 300 (Labnet) a MP-250V (BioTech)

## 5 VÝSLEDKY

V rámci experimentální části byly testovány 4 vzorky celkové RNA ze stromů švestky domácí (*Prunus domestica*) infikovaných ACLSV. Tři vzorky pocházely z katastru obce Šumice a čtvrtý vzorek byl získán v NP Podyjí. U všech těchto vzorků byla provedena detekce viru ACLSV pomocí RT-PCR amplifikace (Šimková, 2015).

Celogenomická sekvence českého izolátu ACLSV byla stanovena na základě RT-PCR amplifikace za použití primerů, které byly odvozeny od izolátu P863 ze švestky (Acc. No. M58152). Pomocí dvojic primerů F1/R1, F2/R2, F3/R3, F4/R4, F5/R5 a F6/R6 byly získány PCR produkty očekávané velikosti u 3 vzorků. U vzorků 154 a 155 byly získány pouze fragmenty: 154\_1, 155\_2 a 155\_6. Proto byl pro sestavení celogenomické sekvence vybrán pouze vzorek 158, u kterého se podařilo získat všechny amplifikované segmenty (viz Tabulka č. 4). PCR produkt 158\_1 získaný pomocí primerů F1/R1 měl velikost 1283 nt. PCR produkty 158\_2 a 158\_3 amplifikované pomocí primerů F2/R2 a F3/R3 měly velikost 1479 nt a 1366 nt. PCR fragment 158\_4 byl velký 1504 nt. Fragmenty 158\_5 a 158\_6 měly velikost 1043 nt a 1219 nt (viz Obrázek č. 3, Tabulka č. 5).

Tabulka č. 4: Detekce ACLSV - získané produkty po amplifikaci RT-PCR metodou

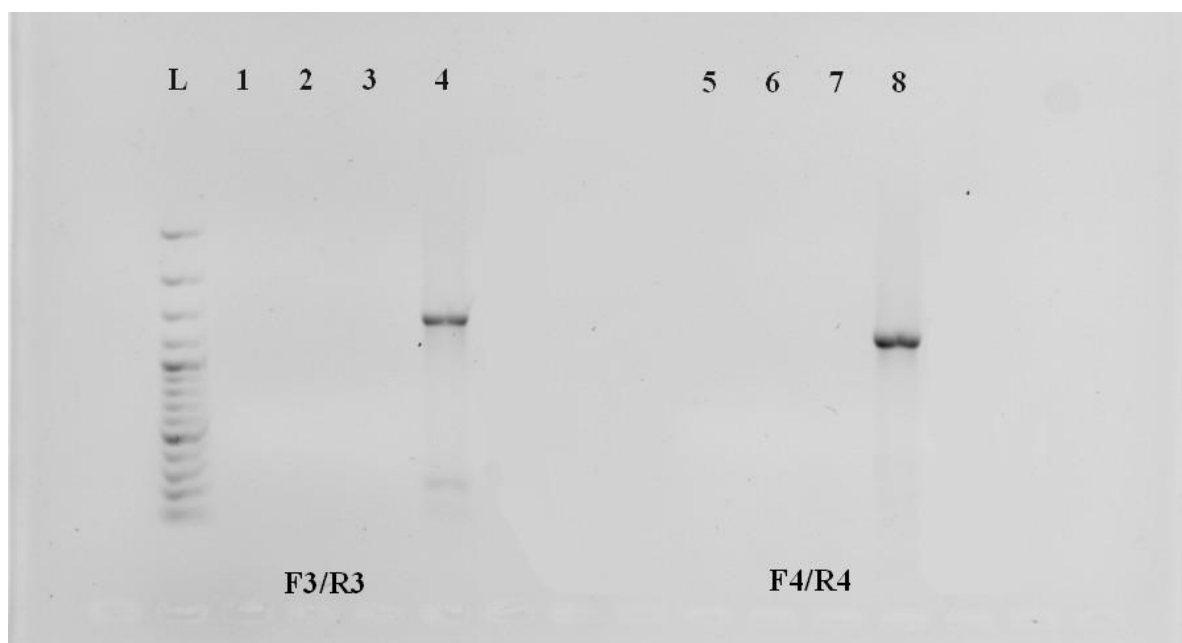
Primer		Vzorek 153	Vzorek 154	Vzorek 155	Vzorek 158
F1	TGATACTGATACAGTGTACACTCACG	-	+	-	+
R1	TTGTCAAAGAACCAATCCTTCATGC	-	+	-	+
F2	AAGAAACCTGATGTACAATC	o	-	+	+
R2	CTTTTGGTAACCTGCAGGCAT	o	-	+	+
F3	AATGAGGAGTGTTATGACGATGA	-	-	-	+
R3	ATCGAACTTTGTTCATCTAT	-	-	-	+
F4	TACTTTTGTCTAAGGATG	-	-	-	+
R4	TGTCGTCCCAACCAAAATG	-	-	-	+
F5	TACCGGATAATTACTACATT	-	-	-	+
R5	TGCATCAATTGATATGGACAGT	-	-	-	+
F6	TTCGTTTTCAAGGTCATGCC	-	-	+	+
R6	TTGATGTTCGGGTCCGAAG	-	-	+	+

(„+“: očekávaný fragment, „-“: žádný produkt, „o“: nespecifický produkt)

Tabulka č. 5: Očekávané a získané velikosti PCR fragmentů izolátu 158 za použití primerů F1/R1, F2/R2, F3/R3, F4/R4, F5/R5 a F6/R6

Použitá dvojice primerů	F1/R1	F2/R2	F3/R3	F4/R4	F5/R5	F6/R6
Očekávaná velikost sekvence (nt)	1281	1481	1363	1506	1040	1217
Získaná velikost sekvence (nt)	1283	1479	1366	1504	1043	1219

Obrázek č. 3: Příklad detekce ACLSV pomocí RT-PCR s použitím primerů F3/R3 a F4/R4



L: GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder; 1,5: vzorek 153; 2,6: vzorek 154; 3,7: vzorek 155; 4,8: vzorek 158; F3/R3, F4/R4: označení použité sady primerů

PCR produkty byly úspěšně zaklonovány do plazmidů pGEM-T a transformovány do bakterií *E.coli* kmene DH5 $\alpha$ . Vybrané 3 pozitivní kolonie od každého zaklonovaného PCR fragmentu, u fragmentu 158\_4 čtyři kolonie, byly sekvenovány pomocí primerů M13F a M13R (viz Tabulka č. 6). Sekvenační výstupy byly pospojovány do kontigů pomocí programu SeqMan.

Tabulka č. 6: Pozitivní kolonie zaklonovaných PCR fragmentů izolátu 158

	Použité kombinace primerů					
	F1/R1	F2/R2	F3/R3	F4/R4	F5/R5	F6/R6
Pozitivní kolonie (X/%)	1_17 (JN634760/94 %)	2_26 (AJ243438/81 %)	3_31 (AB326224/82 %)	4_1 (M58152/85 %)	5_36 (AJ243438/86 %)	6_51 (AB060963/84 %)
	1_18 (M58152/87 %)	2_28 (D14996/78 %)	3_33 (AB326224/82 %)	4_2 (M58152/84 %)	5_37 (AJ243438/87 %)	6_52 (JN634761/93 %)
	1_19 (M58152/86 %)	2_30 (D14996/78 %)	3_34 (JN634760/93 %)	4_3 (M58152/84 %)	5_38 (JN634761/95 %)	6_53 (JN634761/93 %)
				4_4 (M58152/84 %)		
Nt	1283	1481	1366	1504	1043	1219

„X/%“: sekvence ACLSV z databáze GenBank, se kterými naše sekvence vykazovala nejvyšší identitu; „Nt“: získaná délka sekvence (nt)

Pomocí programu BLAST byla potvrzena příslušnost sekvencí získaných ze všech pozitivních kolonií k ACLSV (viz Tabulka č. 6). 3 respektive 4 sekvence získané z jednoho PCR fragmentu (tj. 3-4 kolonie) byly dále porovnány pomocí mnohočetného alignmentu pro stanovení variability jednotlivých segmentů. Bylo potvrzeno, že 3 respektive 4 sekvence každého z PCR produktů nejsou identické, ale vykazují velkou variabilitu. Mezi sekvencí 158\_1\_17 a 158\_1\_18 bylo 193 nukleotidových záměn, mezi 158\_1\_17 a 158\_1\_19 bylo 196 záměn a mezi 158\_1\_18 a 158\_1\_19 bylo 7 záměn. Sekvence fragmentu 158\_2 se vzájemně lišily tak, že mezi sekvencemi 158\_2\_26 a 158\_2\_28 bylo 8 záměn, mezi 158\_2\_26 a 158\_2\_30 bylo 10 záměn a mezi 158\_2\_28 a 158\_2\_30 bylo 12 záměn. Mezi sekvencemi 158\_3\_31 a 158\_3\_33 bylo nalezeno 5 nukleotidových záměn, mezi 158\_3\_31 a 158\_3\_34 bylo 243 záměn a mezi 158\_3\_33 a 158\_3\_34 bylo 244 záměn. Mezi sekvencemi 158\_4\_1 a 158\_4\_2 byly 2 nukleotidové záměny, mezi 158\_4\_1 a 158\_4\_3 bylo 5 záměn, mezi 158\_4\_1 a 158\_4\_4 bylo 6 záměn, mezi sekvencemi 158\_4\_2 a 158\_4\_3 bylo 7 záměn, mezi 158\_4\_2 a 158\_4\_4 bylo 8 záměn a mezi 158\_4\_3 a 158\_4\_4 bylo 11 záměn. U sekvencí 158\_5\_36 a 158\_5\_37 bylo napočítáno 14 záměn, u 158\_5\_36 a 158\_5\_38 bylo 142 záměn a u sekvencí 158\_5\_37 a 158\_5\_38 bylo 132 záměn. Mezi sekvencemi 158\_6\_51

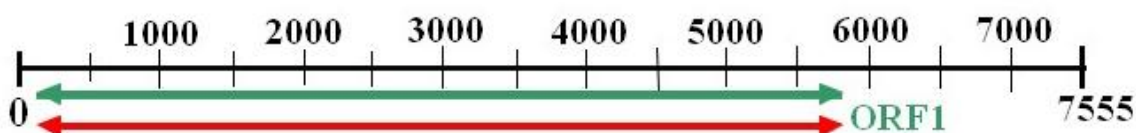


a 158\_6\_52 bylo napočítáno 198 záměn, mezi 158\_6\_51 a 158\_6\_53 bylo 198 záměn a mezi sekvencemi 158\_6\_52 a 158\_6\_53 bylo 8 nukleotidových záměn.

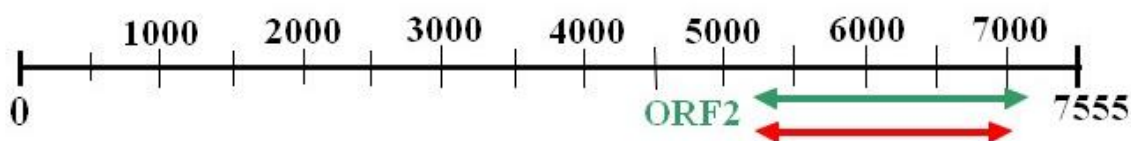
Celogenomická sekvence byla získána složením dílčích sekvencí, a to těch, které vykazovaly nejvyšší identitu s referenčním genomem NC\_001409 z *P. domestica*. Výsledná sekvence byla poskládána z fragmentů 158\_1\_18, který vykazoval identitu 87 % s referenčním genomem NC\_001409, 158\_2\_30 s identitou 72 %, 158\_3\_31 s identitou 82 %, 158\_4\_1 s identitou 85 %, 158\_5\_37 s identitou 84 % a 158\_6\_53, který vykazoval identitu 83 %.

V programu SeqMan byly vybrané sekvence pospojovány do výsledné téměř celogenomické sekvence o velikosti 7074 nt. Z databáze GenBank byly získány sekvence jednotlivých čtecích rámců (ORF1 až 3) referenčního genomu a pomocí alignmentu byly přiřazeny k sekvenci testovaného izolátu 158. Tímto přiřazením bylo zjištěno, které části čtecích rámců se podařilo osekvenovat (viz Obrázek č. 4, 5, 6). Byla získána sekvence celého prvního čtecího rámce o délce 5655 nt. Ze sekvence druhého čtecího rámce (1383 nt) byla získána sekvence o délce 1357 nt. V případě třetího čtecího rámce byla získána sekvence o délce 291 nt z celkové délky 582 nt.

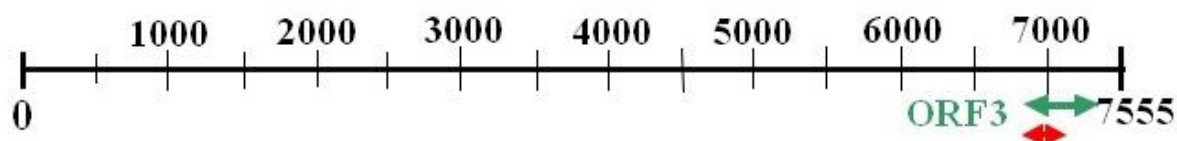
Obrázek č. 4: Čtecí rámeček ORF1 - úsek získaný RT-PCR amplifikací (označeno červeně)



Obrázek č. 5: Čtecí rámeček ORF2 - úsek získaný RT-PCR amplifikací (označeno červeně)



Obrázek č. 6: Čtecí rámeček ORF3 - úsek získaný RT-PCR amplifikací (označeno červeně)

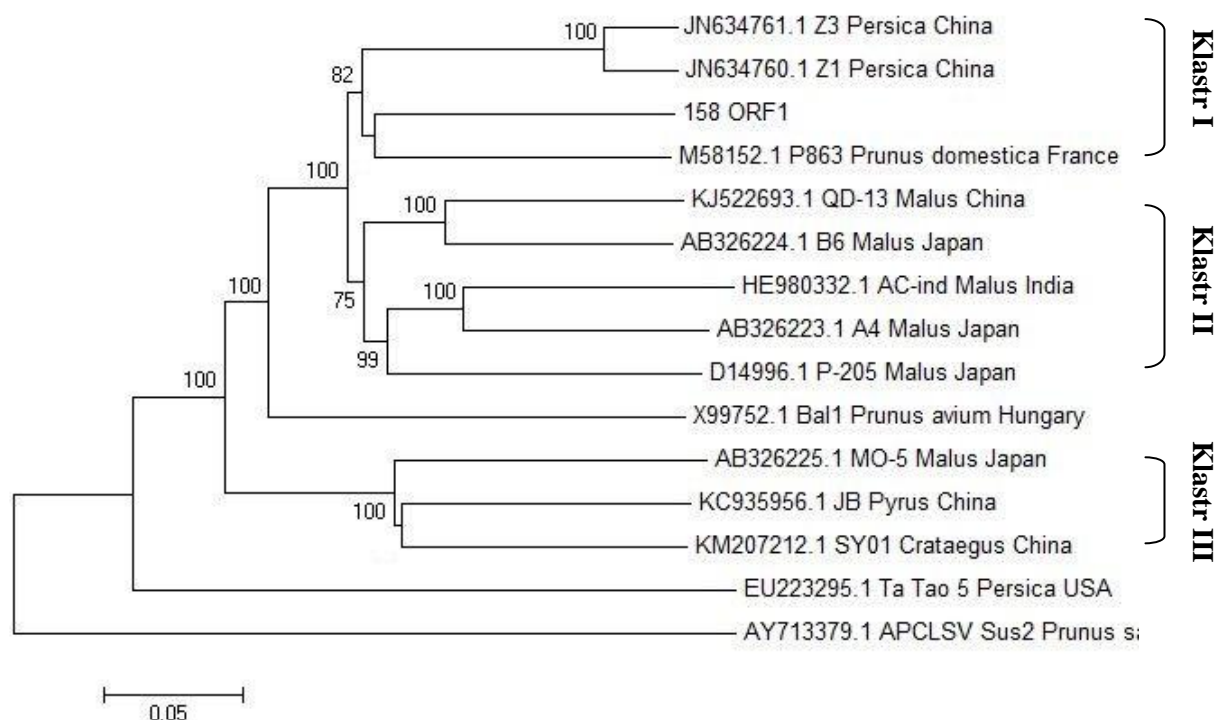


Získané sekvence jednotlivých čtecích rámců byly opět porovnány pomocí programu BLAST s dostupnými sekvencemi z databáze GenBank. Sekvence prvního čtecího rámce (5655 nt) vykazovala 83% identitu s evropským izolátem P863 (Acc. No. M58152), který byl získán ve Francii z *Prunus domestica* a stejnou identitu s čínskými izoláty Z1 (Acc. No. JN634760) a Z3 (Acc. No. JN634761) z *Prunus persica*. Sekvence druhého čtecího rámce (1360 nt) vykazovala identitu 93 % s izolátem Z3 (Acc. No. JN634761) a 92 % s izolátem Z1 (Acc. No. JN634760), které oba pochází z Číny z *P. persica*; získaná sekvence vykazovala pouze 84% identitu se zvoleným referenčním genomem (Acc. No. M58152). Získaná část třetího čtecího rámce (291 nt) vykazovala 96% identitu s izolátem Z3 a 93% identitu s izolátem Z1 z Číny z *P. persica* a identitu 86 % s francouzským izolátem P863 (Acc. No. M58152) z *P. domestica*.

Provedená fylogenetická analýza izolátu 158 ACLSV potvrdila, že nejbližšími příbuznými jsou francouzský izolát P863 (Acc. No. M58152) z *Prunus domestica* a čínské izoláty Z1 (Acc. No. JN634760) a Z3 (Acc. No. JN634761) z *Prunus persica*.

Čtecí rámec ORF1 českého izolátu o délce 5655 nt vytvořil společnou větev s izolátem P863 z Francie z *Prunus domestica*. Dalšími nejbližšími příbuznými jsou izoláty Z1 a Z3 z Japonska z *Prunus persica*, tvořící samostatný klast (klast I). Druhou skupinu vytvořily indické, čínské a japonské izoláty z *Malus domestica* (klast II). Izolát Ball z *Prunus avium* z Maďarska tvořil samostatnou větev. Poslední větev tvoří izoláty z hostitelů *Malus domestica*, *Pyrus bretschneideri* a *Crataegus pinnatifida* získaných z Číny a Japonska (klast III). Izolát TaTao 5 z USA z *Prunus persica* vytvořil úplně samostatnou větev (viz Obrázek č. 7).

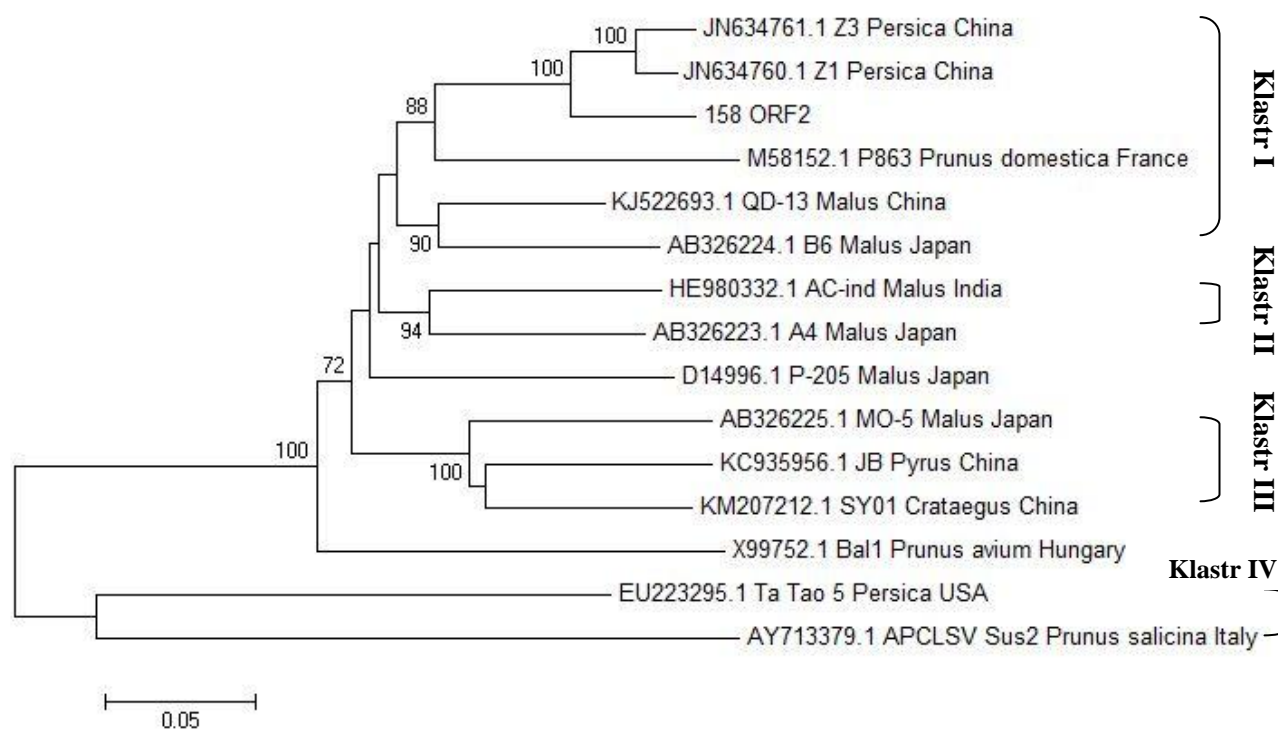
Obrázek č. 7: Fylogenetický strom izolátů ACLSV - čtecí rámec ORF1



Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty  $\geq 70$ . Jako outgroup použit izolát Sus2 APCLSV (AY713379.1).

U druhého čtecího rámce ORF2 izolátu 158 o velikosti 1357 nt se vytvořilo podobné větvení, jako tomu bylo u ORF1. Izolát 158 vykazoval vysokou příbuznost s izoláty Z1 a Z3 z *P. persica* z Číny. Do společné větve patří také i francouzský izolát *P. domestica* a izoláty z *M. domestica* z Číny a Japonska (klastr I). Další skupinu tvoří izoláty AC-ind (Indie) a A4 (Japonsko) z *M. domestica* (klastr II). Japonský izolát P-205 (*M. domestica*) vytvořil samostatnou větev. Izoláty z hostitelů *M. domestica*, *P. bretschneideri* a *C. pinnatifida* získané z Číny a Japonska tvořily další větev (klastr III). Izolát z *Prunus avium* z Maďarska představoval samostatnou větev. Izolát TaTao 5 z USA z *P. persica* vytvořil společnou větev s izolátem Sus2 (APCLSV), který byl vybrán jako outgroup (klastr IV) (viz Obrázek č. 8).

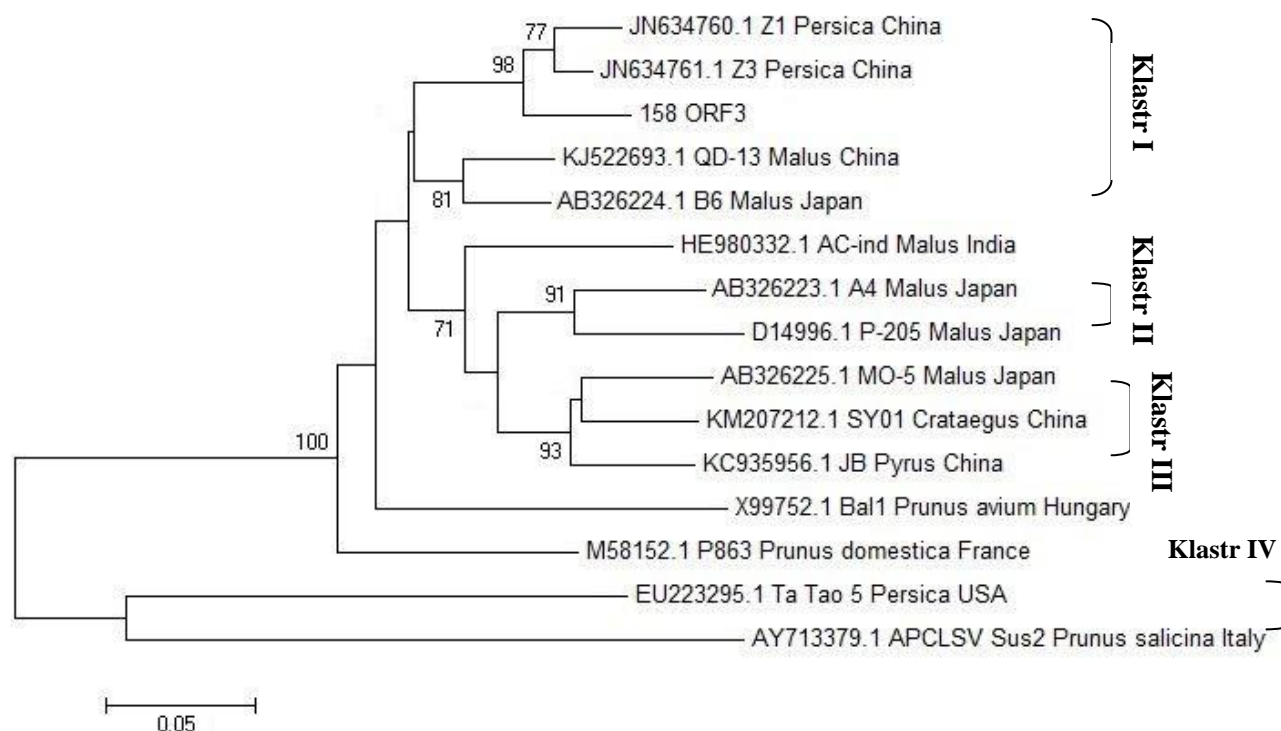
Obrázek č. 8: Fylogenetický strom izolátů ACLSV - čtecí rámec ORF2



Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty  $\geq 70$ . Jako outgroup použit izolát Sus2 APCLSV (AY713379.1).

Z fylogenetického stromu třetího čtecího rámce podle sekvence o délce 291 nt vyplynula příbuznost českého izolátu s izoláty z Číny a Japonska z hostitelských rostlin *M. domestica* a *P. persica* (klastr I). Druhou skupinu tvoří japonské izoláty z *M. domestica* (klastr II). Izolát AC-ind (Indie) z *M. domestica* se vyvětvil samostatně. Poslední větší větev vytvořily izoláty z *M. domestica*, *P. bretschneideri* a *C. pinnatifida* pocházejících z asijských zemí (Indie, Japonsko a Čína) (klastr III). Izoláty Bal1 z *P. avium* z Maďarska a P863 z *P. domestica* z Francie vytvořily zcela individuální větve. Izolát TaTao 5 z USA z *P. persica* vytvořil společnou větev s izolátem Sus2 APCLSV, stejně jako tomu bylo u fylogenetického stromu čtecího rámce ORF2 (klastr IV) (viz Obrázek č. 9).

Obrázek č. 9: Fylogenetický strom izolátů ACLSV - čtecí rámec ORF3



Izoláty jsou popsány Accession number, označením izolátu, hostitelskou rostlinou a zemí původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou pouze bootstrap hodnoty  $\geq 70$ . Jako outgroup použit izolát Sus2 APCLSV (AY713379.1).

Z fylogenetických stromů izolátů ACLSV zpracovaných pro jednotlivé čtecí rámce vyplývala jistá hostitelská i geografická specifita. Izoláty ACLSV infikující jabloně (*Malus spp.*) a broskvoně (*P. persica*) tvořily jednotlivé klastry podle původního hostitele. Stejná situace byla pozorována v rámci izolátů z Japonska a Číny, u kterých taktéž došlo k rozdělení do zřetelných větví podle geografického rozšíření. Výjimku u rozdělení podle hostitelské specifity představovaly izolát MO-5 z *Malus domestica*, izolát JB z *Pyrus bretschneideri* a izolát SY01 z *Crataegus pinnatifida*, které vytvořily společnou větev u fylogenetických stromů všech čtecích rámců.

## 6 DISKUZE

*Apple chlorotic leaf spot virus* je rozšířen téměř po celém světě, především v oblastech, kde se komerčně pěstují ovocné druhy peckovin a jaderovin. Mezi nejběžnější hostitele patří především jabloně, u kterých byl tento virus poprvé detekován. Infekce virem byla zaznamenána u řady zástupců čeledi *Rosaceae*. Na území České republiky byl zaznamenán výskyt ACLSV především u jabloní, oproti tomu u švestek a slivoní byl virus detekován jen výjimečně. V řadě případů se jedná spíše o směsné infekce s jinými viry (Németh, 1986; Yoshikawa, 2001; Rana a kol., 2010; Svoboda a Polák, 2010). V rámci experimentu byl virus detekován u 3 testovaných vzorků z kulturních švestek (*P. domestica*).

U ACLSV byl popsán vysoký stupeň genetické variability mezi izoláty z různých hostitelů a různých zemí, jako důsledek přizpůsobování se hostiteli a podmínkám prostředí. Vysoká variabilita byla popsána u několika oblastí genomu a zároveň byla popsána i konzervativní místa. Byla charakterizována variabilita u 3 oblastí, a to u segmentu na pozici 602-672 nt za methyl transferázové domény ORF1, C' koncové části rámce ORF2 a N' koncové části rámce ORF3. Současně byla sledována celkově vysoká variabilita v sekvenci ORF1 mezi izoláty ACLSV. U čtecího rámce ORF3 bylo prokázáno, že N' konec je velmi variabilní, zatímco C' konec vykazuje poměrně konzervovanou sekvenci. Na pozicích 5565-5570 a 6593-6598 byl identifikován konzervovaný hexanukleotidový motiv UUAGGU (German-Retana a kol. 1997; Al Rwahnih a kol., 2004; Luring a Andino, 2010; Rana a kol., 2010; Komatsu a kol., 2012; Dhir a kol., 2013). U izolátu 158 byla pozorována celková variabilita vzhledem k referenčnímu genomu, a to 18 %. U prvního čtecího rámce byla variabilita poměrně vysoká, přesněji 19 %. U oblasti za methyl transferázovou doménou byla variabilita 13 %. Sekvenováním nebyla získána celá C' koncová oblast ORF2, proto bylo možné pouze zčásti odhadnout variabilitu. Variabilita u N' konce ORF3 se shodovala s popsávanými poznatky, ale C' konec nebylo možné porovnat stejně, jako tomu bylo u ORF2. Hexanukleotidový motiv UUAGGU byl nalezen na pozicích 5573-5578 a 6601-6606, tedy vždy posunut o 6 nukleotidů oproti publikovaným informacím.

Kombinace aminokyselin na pozicích 40, 59, 75, 130 a 184 u CP genu dala vznik klasifikaci izolátů ACSLV na dvě konzervované skupiny. Klastř P205 obsahuje kombinaci aminokyselin Ala<sup>40</sup>, Val<sup>59</sup>, Phe<sup>75</sup>, Ser<sup>130</sup> a Met<sup>184</sup> a klastř B6 zahrnuje izoláty s kombinací Ser<sup>40</sup>, Leu<sup>59</sup>, Tyr<sup>75</sup>, Thr<sup>130</sup> a Leu<sup>184</sup> (Yaegashi a kol., 2007). Translací nukleotidové sekvence ORF3 izolátu 158 do sledu aminokyselin bylo získáno vlákno o 97 aminokyselinách, proto byly porovnány

pouze pozice 40, 59 a 75. Na pozici 40 byl kódován glycin (Gly), což neodpovídalo ani jednomu z popsaných typů. Pozice 59 a 75 obsahovaly leucin (Leu) a tyrosin (Tyr), což by naznačovalo příslušnost izolátu 158 k typu B6.

Celková genetická variabilita mezi izolátem 158 a referenčním genomem byla vysoká. Variabilita mezi těmito dvěma sekvencemi byla 18 %. Tato hodnota odpovídala zjištěným hodnotám variability (10-20 %) mezi izoláty z různých zemí (Al Rwahnih a kol., 2004). Mezi testovaným izolátem a referenčním genomem bylo celkem 1291 nukleotidových záměn. Jak bylo zmíněno výše, variabilita u čtecího rámce ORF1 byla 19 %, tedy 1077 záměn. U čtecího rámce ORF2 byla variabilita 16 %, konkrétně 222 nukleotidových záměn. Sekvence čtecího rámce ORF3, dlouhá 291 nt, vykazovala 14% (41 záměn) variabilitu vůči referenčnímu genomu. Na bázi aminokyselin byla celková variabilita 37 %, tedy poměrně vysoká. Aminokyselinové složení u čtecího rámce ORF1 se lišilo od referenčního genomu o 10 %. Variabilita sledu aminokyselin u čtecího rámce ORF2 byla 14 % a u čtecího rámce ORF3 byla 12 %. V překrývajících se oblastech jednotlivých PCR fragmentů byly nukleotidové záměny, ale sled aminokyselin byl méně variabilní, což bylo způsobeno výskytem tichých mutací.

Fylogenetická analýza celogenomické sekvence izolátu 158 a dostupných sekvencí z databáze GenBank potvrdila již zjištěný vysoký stupeň genetické variability. Jednotlivé fylogenetické stromy se svým rozvětvením od sebe lišily, především dendrogram pro čtecí rámec ORF1 od dendrogramů pro čtecí rámce ORF2 a ORF3. Zatímco fylogenetická analýza čtecího rámce ORF1 ukázala, že nejbližším příbuzným k českému izolátu 158 je francouzský izolát P863 z *Prunus domestica*, u fylogenetických stromů pro čtecí rámce ORF2 a ORF3 se český izolát vyvětvil do společné větve s čínskými izoláty Z1 a Z3 z *Prunus persica*. U fylogenetického stromu čtecího rámce ORF3 dokonce izolát P863 vytvořil zcela samostatnou větev, oddělenou od ostatních izolátů. Sekvence čtecích rámců ORF2 a ORF3 u amerického izolátu TaTao 5 vykazovala příbuznost s izolátem Sus2 APCLSV, který byl použit jako outgroup. Možným vysvětlením pro tato různá rozvětvení u jednotlivých čtecích rámců je rekombinace mezi izoláty v průběhu evoluce. Toto zjištění podporují také dřívější výzkumy ohledně rekombinací u virů z čeledi *Betaflexiviridae*, jakožto poměrně častých procesů v rámci evoluce RNA virů. Bylo také navrženo možné spojení těchto rekombinací s úspěšnou adaptací na nové hostitelské druhy (Worobey a Holmes, 2000; Marais a kol., 2015).

Dřívější sestavení fylogenetického stromu pro české izoláty z *Prunus domestica* na základě sekvencí dlouhých 289 bp ukazovalo na zřetelně rozdělení izolátů do jednotlivých větví podle původních hostitelů (Šimková, 2015). Francouzský izolát P863 z *Prunus domestica* byl i při této analýze jedním z nejvíce příbuzných izolátů pro izolát 158. Izoláty Z1 a Z3 oproti tomu nevykazovaly žádnou bližší příbuznost s českými izoláty. Další větvení bylo taktéž odlišné, kdy například izoláty SY01 z *Crataegus pinnatifida* a Bal1 z *Prunus avium* v dřívější fylogenetické analýze vykazovaly větší příbuznost k českým izolátům, než tomu bylo u analýzy celogenomických sekvencí.

Zjištěná hostitelská a geografická specifita byla vysoká, protože u získaných fylogenetických stromů došlo k vytvoření samostatných větví podle původních hostitelů i geografického rozšíření.



## 7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla sestavena téměř kompletní celogenomická sekvence *Apple chlorotic leaf spot virus*. Získaná sekvence měla délku 7074 nt pokrývající 94 % z celkové délky sekvence referenčního genomu (NC\_001409). Byla získána celá sekvence prvního čtecího rámce, téměř celá sekvence čtecího rámce ORF2 (98 %) a 50 % ze sekvence čtecího rámce ORF3. Dříve popsaná variabilita genomu u různých izolátů byla pozorována také u českého izolátu. Byla potvrzena variabilita pouze u dvou ze tří hlavních oblastí genomu, protože C' koncovou oblast „movement“ proteinu se nepodařilo získat. Fylogenetická analýza ukázala na příbuznost českého izolátu s francouzským izolátem z *Prunus domestica* a s čínskými izoláty z *Prunus persica*. Výsledky potvrdily vysokou variabilitu izolátů ACLSV na úrovni hostitelské i geografické specifity a naznačily možnost rekombinací mezi izoláty. Tyto výsledky ukazují na další možnosti studia ACLSV analyzováním rekombinací mezi izoláty, které by mohly přinést nový pohled na evoluci ACLSV. Dalším krokem pro kompletní analýzu genomu ACLSV je získání druhé části sekvence čtecího rámce ORF2 a 3' nepřekládané oblasti pomocí 3' RACE PCR.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., Fauquet, C. M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-1060.
- Afechtal, M., Djelouah, K., D'Onghia, A. M. (2010): The first survey of pome fruit viruses in Morocco. 21st International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 253-256.
- Al Rwahnih, M., Turturo, C., Minafra, A., Saldarelli, P., Myrta, A., Pallás, V., Savino, V. (2004): Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology* 86: 117-122.
- Bar-Joseph, M., Hull, R., Lane, L. C. (1974): Biophysical and biochemical characterization of *Apple chlorotic leafspot virus*. *Virology* 62: 563-566.
- Borisova, A., Christov, N. (2014): Detection of viruses infecting sweet cherry cultivars and elites at the institute of Agriculture-Kyustendil, Bulgaria. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 6: 701-705.
- Çağlayan, K., Ulubas Serçe, C., Gazel, M., Jelkmann, W. (2006): Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30: 241-246.
- Cai, Y., Xiang, B. C., Xi, D. H., Liu, S. X., Du, Y. J. (2005): Cloning and prokaryotic expression of CP gene of *Apple chlorotic leaf spot virus* Kuerle isolate and preparation of its specific antiserum. *Journal of Agricultural Biotechnology* 13: 533-537.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L., Lommel, S. A. (2001): The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39: 419-60.

- Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Macquaire, G., German, S., Dunez, J., Grasseau, N., Malinovsky, T. (1995): An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Horticulturae* 386: 136-147.
- Cembali, T., Folwell, R. J., Wandschneider, P., Eastwell, K. C., Howell, W. E. (2003): Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. *Crop Protection* 22: 1149–1156.
- Cieślińska, M. (2004): Detection of *Strawberry mottle virus* (SMoV) using RT-PCR - comparison of two RNA extraction methods. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 12: 17-22.
- Cieślińska, M. (2007): Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 117-124.
- Constable, F. E., Joyce, P. A., Rodoni, B. C. (2007): A survey of key Australian pome fruit growing districts for exotic and endemic pathogens. *Australasian Plant Pathology* 36: 165-172.
- Detienne, G., Delbos, R., Dunez, J., (1981): Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of an *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum* 15: 39–45.
- Dhir, S., Zaidi, A. A., Hallan, V. (2013): Molecular characterization and recombination analysis of the complete genome of *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Journal of Phytopathology* 161: 704-712.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (1999): Certifikační schéma pro mandloň, meruňku, broskvoň a švestku. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 29: 239-252.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2001): Materiál rodů *Malus*, *Pyrus* a *Cydonia* testovaný na přítomnost škodlivých organismů. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31: 463-478.

- Fajardo, T. V. M., Nickel, O. (2014): Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. *Ciência Rural* 44: 1711-1714.
- Farrag, A. A., Ibrahim, I. A. M., Mazyad, H. M. (2005): Detection and characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) isolates from peach orchards in Egypt. *International Journal of Virology* 1: 27-27.
- Gadiou, S., Kundu, J. K., Paunovic, S., Garcia-Diez, P., Komorowska, B., Gospodaryk, A., Handa, A., Massart, S., Birisik, N., Takur, P. D., Polischuk, V. (2010): Genetic diversity of *Flexiviruses* infecting pome fruit trees. *Journal of Plant Pathology* 92: 685-691.
- García-Ibarra, A., Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., Soler, A., Sánchez-Navarro, J. A. (2010): Pollen and seed transmission of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in apricot. *Acta horticulturae* 862: 483-487.
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J. C., Pernollet, J. C., Dunez, J. (1990): Nucleotide sequence and genomic organization of *Apple chlorotic leaf spot closterovirus*. *Virology* 179: 104-112.
- German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R. P., Candresse, T., Dunez, J. (1997): Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of Virology* 142: 833-841.
- Cho, I. S., Cho, J. D., Choi, S. K., Choi, G. S. (2012): Occurrence of pome fruit viruses on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) in Korea. *Research in Plant Disease* 16: 326-330.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus Taxonomy: 2014 Release, EC 46, Montreal, Canada, July 2014, Email ratification 2015 (MSL #29). <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus Taxonomy: 2009 Release, ICTV 9th Report; EC41: Leiden, June 2009; Email ratification 2009 (MSL #25). <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Ismaeil, F., Al-Jabor, K., Myrta, A., Mando, M. J., Al-Saadoun, E., Hassan, M., Al-Chaab, S. (2006): Viruses of pome fruit trees in Syria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36: 65-68.

- Isogai, M., Yaegashi, H., Yoshikawa, N. (2007): The multifunctional roles of *Apple chlorotic leaf spot virus* 50KP movement protein. Global Science Books, Plant Viruses 1: 135-141.
- Jan, F. J., Wu, Z. B., Kuo, A. J., Zheng, Y. X., Chang, H. H., Su, C. C., Yang, Y. S. (2003): Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving viruses* by the method of reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Pathology Bulletin 12: 10-18.
- Jarošová, J., Polák, J., Kumar, J. (2008): Metodika molekulární detekce virů peckovin pomocí RT-PCR a multiplex-RT-PCR. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Jelkmann, W. (1996): The nucleotide sequence of a strain of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain. Phytopathology 86: S101.
- Karešová, R., Paprštejn, F. (2001): *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. Acta Horticulturae 550: 259-264.
- Katsiani, A. T., Maliogka, V. I., Candresse, T., Katis, N. I. (2014): Host-range studies, genetic diversity and evolutionary relationships of ACLSV isolates from ornamental, wild and cultivated Rosaceous species. Plant Pathology 63: 63–71.
- Keshavarz, T., Shams-Bakhsh, M. (2015): Incidence and distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* in the main fruit growing areas of Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection 48: 306-312.
- Komatsu, K., Hirata, H., Fukagawa, T., Yamaji, Y., Okano, Y., Ishikawa, K., Adachi, T., Maejima, K., Hashimoto, M., Namba, S. (2012): Infection of capilloviruses requires subgenomic RNAs whose transcription is controlled by promoter-like sequences conserved among flexiviruses. Virus Research 167: 8-15.
- Lauring, A. S., Andino, R. (2010): Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. PLoS Pathogens 6: e1001005.
- Lister, R. M. (1970): *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 30.
- Liu, F., Wang, H. (1989): On latent viruses of apple in China II. Indexing of latent viruses in apple scion varieties and dwarf rootstocks. Acta Phytopathologica Sinica 19: 193-197.

- Lolić, B., Matić, S., Đurić, G., Hassan, M., Di Serio, F., Myrta, A. (2010): Pome fruit viruses in Bosnia and Herzegovina. 21st International Conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 245-247.
- Mahfoudhi, N., Elair, M., Salleh, W., Moujahed, R., Djelouah, K. (2013): Occurrence and distribution of pome fruit viruses in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 136–140.
- Malan, S. S. (2015): The importance of planting certified trees that are free of *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV). *Hortgro Science*: 70-71.
- Mandic, B., Matić, S., Rwahnih, M. A., Jelkmann, W., Myrta, A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology* 89: 103–108.
- Marais, A., Faure, C., Mustafayev, E., & Candresse, T. (2015): Characterization of new isolates of *Apricot vein clearing-associated virus* and of a new *Prunus*-infecting virus: Evidence for recombination as a driving force in *Betaflexiviridae* evolution. *PLoS ONE* 10: e0129469.
- Marini, D. B., Gibson, P. G., Scott, S. W. (2008): The complete nucleotide sequence of an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica* (L.) Batch). *Archives of Virology* 153: 1003-1005.
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., Dolja, V. V. (2007): Family *Flexiviridae*: A case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45: 73-100.
- Martelli, G. P., Candresse, T., Namba, S. (1994): Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 134: 451-455.
- Massart, S., Brostaux, Y., Barbarossa, L., César, V., Cieślińska, M., Dutrecq, O., Fonseca, F., Guillem, R., Laviña, A., Olmos, A., Steyer, S., Wetzel, T., Kummert, J., Jijakli, M. H. (2008): Inter-laboratory evaluation of a duplex RT-PCR method using crude extracts for the simultaneous detection of *Prune dwarf virus* and *Prunus necrotic ringspot virus*. *European Journal of Plant Pathology* 122: 539-547.

- Mathioudakis, M. M., Maliogka, V. I., Katsiani, A. T., Katis, N. I. (2010): Incidence and molecular variability of *Apple stem pitting* and *Apple chlorotic leaf spot* viruses in apple and pear orchards in Greece. *Journal of Plant Pathology* 92: 139-147.
- Melcher, U. (1990): Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *Journal of General Virology* 71: 1009-1018.
- Melcher, U. (2000): The '30K' superfamily of viral movement proteins. *Journal of General Virology* 81: 257-266.
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E. (2002): Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* 99: 81–92.
- Mushegian, A. R., Koonin, E. V. (1993): Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Archives of Virology* 133: 239-257.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G. P. (2003): Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V.: *Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region*. *Options Mediterranée, Série B. Etudes et Recherches* 45: 15-23.
- Németh, M. V. (1986): *Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Niu, F., Pan, S., Wu, Z. J., Jiang, D., Li, S. (2012): Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica*) in China. *Archives of Virology* 157: 783–786.
- Polák, J. (2007): Viruses of blackthorn and road-bordering trees of plum, myrobalan, sweet and sour cherries in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 43: 1-4.
- Polák, J., Svoboda, J. (2006): The reliability of detection and the distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* in pears in the Czech Republic. *Horticultural Science* 33: 7–10.
- Polák, J., Svoboda, J. (2010): Metodika diagnostiky ApMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

- Popescu, S., Constantin, G., Mazilu, C. R. (2004): Apple viral diseases diagnosed in the germplasm collection at ICDP Maracineni-Romania. *Acta Horticulturae* 657: 51–54.
- Pūpola, N., Moročko-Bičevska, I., Kāle, A., Zeltiņš, A. (2011): Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. *Journal of Phytopathology* 159: 597–605.
- Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., Zaidi, A. A. (2007a): Molecular evidence for the presence of *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected peach trees in India. *Scientia Horticulturae* 120: 296–299.
- Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., Zaidi, A. A. (2007b): Molecular evidence for *Apple chlorotic leaf spot virus* in wild and cultivated apricot in Himachal Pradesh, India. *Journal of Plant Pathology* 89: 72.
- Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., Zaidi, A. A. (2008): Characterisation of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 65-67.
- Rana, T., Chandel, V., Kumar, Y., Ram, R., Hallan, V., Zaidi, A. A. (2010): Molecular variability analyses of *Apple chlorotic leaf spot virus* capsid protein. *Journal of Biosciences* 35: 605-15.
- Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A. (2005): Viruses of pome fruit trees in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 87: 123-126.
- Sato, K., Yoshikawa, N., Takahashi, T. (1993): Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology* 74: 1927-1931.
- Sato, K., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Taira, H. (1995): Expression, subcellular location and modification of the 50 kDa protein encoded by ORF2 of the *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* genome. *Journal of General Virology* 76: 1503-1507.
- Satoh, H., Matsuda, H., Kawamura, T., Isogai, M., Yoshikawa, N., Takahashi, T. (2000): Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *Journal of General Virology* 81: 2085-2093.



- Song, Y., Hong, N., Wang, L., Hu, H., Tian, R., Xu, W., Ding, F., Wang, G. (2011): Molecular and serological diversity in *Apple chlorotic leaf spot virus* from sand pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *European Journal of Plant Pathology* 130: 183-196.
- Spiegel, S., Rosner, A., Thompson, D., Varga, A., James, D. (2006): Evaluation of reverse transcription – polymerase chain reaction assays for detecting *Apple chlorotic leaf spot virus* in certification and quarantine programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 280-288.
- Šimková, L. (2015): Viry slivoní v kulturním a planém patosystému. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- Wang, G. P., Hong, N., Zhang, Z. P., Hu, S. C., Dong, Y. F. (1994): Identification of virus species in pears cultivated in northern China. *China Fruits* 4: 1–4.
- Wang, L. P., Hong, N., Matić, S., Myrta, A., Song, Y. S., Michelutti, R., Wang, G. P. (2011): Pome fruit viruses at the Canadian Clonal Genebank and molecular characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates. *Scientia Horticulturae* 130: 665–671.
- Wang, L. P., Wang, G. P., Hong, N., Tang, R., Deng, X. (2006): Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for in vitro-cultured pear shoot tips. *HortScience* 41: 729-732.
- Waterworth, H. (1993): Processing foreign plant germplasm at the National Plant Germplasm Quarantine Center. *Plant Disease* 77: 854-860.
- Wood, G. A. (1974): Latent viruses of apple in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 17: 85-91.
- Worobey, M., Holmes, E. C. (2000): Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology* 80: 2535-2543.
- Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T., Yoshikawa, N. (2007): Combinations of two amino acids (Ala<sup>40</sup> and Phe<sup>75</sup> or Ser<sup>40</sup> and Tyr<sup>75</sup>) in the coat protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* are crucial for infectivity. *Journal of General Virology* 88: 2611-2618.
- Yanase, H. (1974): Studies on apple latent viruses in Japan. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station C1*: 47-109.

- Yoshikawa, N. (2001): *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 386.
- Yoshikawa, N., Takahashi, T. (1988): Properties of RNAs and proteins of *Apple stem grooving* and *Apple chlorotic leaf spot viruses*. Journal of General Virology 69: 241-245.
- Zawadzka, B. (2013): Studies of pome and stone fruit tree virus diseases in Poland with special emphasis on varieties recently introduced from Eastern Countries, final technical report 1964-1968. Research Institute of Pomology
- Zhao, Z., Yu, Y., Zhang, Z., Liang, P., Ma, X., Li, S., Wang, H. (2013): A duplex, SYBR Green I-based RT-qPCR assay for the simultaneous detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Cherry green ring mottle virus* in peach. Virology Journal 10: 255-261.
- Zheng, Y. Y., Wang, G. P., Hong, N., Song, Y. S., You, H. (2007): Partial molecular characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach and apple trees and prokaryotic expression for cp gene. Acta Phytopathologica Sinica 37: 356–361.