

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra ochrany rostlin



Diagnostika významných virů jableň

Doktorská disertační práce

Vedoucí práce: **Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.**

Konzultant: **Ing. Lenka Grimová, Ph.D.**

Autor práce: **Ing. Lucie Winkowska**

2016

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma Diagnostika významných virů jabloní vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne 22. 5. 2016

Poděkování

Velké poděkování patří mojí konzultantce Ing. Lence Grimové, Ph.D., bez jejíž pomoci a rad by se mé studium, a s tím spojená nejenom laboratorní práce, ale i moje pokusy o publikační činnost, nevyvíjelo tak hladce a zdárně. Neméně významné poděkování jí patří také za čas, který mi věnovala, za důvěru, kterou ve mě a v mé schopnosti vkládala, a za podporu, kterou jsem u ní vždy našla a to nejen v pracovním, ale i osobním životě.

Ráda bych poděkovala i vedoucímu své disertační práce Prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc., za cenné rady a věcné připomínky, které napomohly dalšímu rozvoji mojí práce v průběhu studia.

S úsměvem na tváři děkuji svým spolužákům a ostatním členům katedry ochrany rostlin, kteří vytvářeli přátelské pracovní prostředí, a pokud jsem potřebovala, byli vždy ochotni mi pomoci a podpořit mě v mé práci.

V neposlední řadě chci poděkovat svému manželovi Pawlovi, že mě po celou dobu studia podporoval a pomáhal mi vše zvládnout.

Také děkuji své rodině a přátelům, že byli ochotni se zájmem naslouchat starostem, ale i radostem, spojeným s mým studiem.

Tato disertační práce byla vypracována s přispěním grantu CIGA č. 20142017 - Detekce a kvantifikace viru mozaiky jabloně a dalších významných virů jabloní pomocí real-time PCR.

Obsah

Obsah	1
Seznam tabulek a obrázků v textu.....	3
1. Úvod.....	5
2. Vědecké hypotézy a cíle práce.....	6
3. Literární rešerše	7
3.1. Významné viry jabloní	7
3.1.1. Virus mozaiky jabloně	8
3.1.2. Virus žlábkovitosti kmene jabloně.....	14
3.1.3. Virus vrásčitosti kmene jabloně.....	18
3.1.4. Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně	21
3.2. Metody detekce virů jabloní.....	25
3.2.1. Detekce vybraných virů pomocí indikátorových rostlin.....	25
3.2.2. Sérologické testy	27
3.2.3. Molekulárně-genetické techniky.....	28
3.3. Možnosti ochrany proti virům jabloní.....	30
4. Metodika	31
4.1. Optimalizace diagnostických metod.....	31
4.1.1. Rostlinný materiál	31
4.1.2. Sérologická metoda DAS/I ELISA	31
4.1.3. Molekulární metoda RT-PCR	33
4.1.4. Molekulární metoda qRT-PCR	37
4.2. Kvantifikace vybraných virů	41
4.2.1. Rostlinný materiál	41
4.2.2. Relativní kvantifikace jabloňových virů pomocí sérologických technik.....	41
4.2.3. Relativní kvantifikace jabloňových virů pomocí RT-PCR	42
4.2.4. Absolutní kvantifikace jabloňových virů pomocí qRT-PCR.....	43
4.3. Monitoring vybraných virů.....	53
4.4. Studium molekulární variability.....	56
4.4.1. Výběr izolátů.....	56
4.4.2. Příprava vzorků na sekvenaci	57
4.4.3. Analýza sekvencí	58
5. Výsledky	60

5.1.	Optimalizace diagnostických metod.....	60
5.2.	Kvantifikace virů.....	66
5.2.1.	ApMV	67
5.2.2.	ASGV.....	69
5.2.3.	ASPV	72
5.2.4.	ACLSV.....	74
5.3.	Monitoring vybraných virů.....	78
5.4.	Studium molekulární variability.....	82
5.4.1.	ApMV	82
5.4.2.	ASGV.....	82
5.4.3.	ASPV	83
5.4.4.	ACLSV.....	83
6.	Diskuze	85
7.	Závěr	92
8.	Literatura.....	94
9.	Seznam příloh	106
10.	Seznam publikací	107

Seznam tabulek a obrázků v textu

Tabulky

Tabulka 1. Významné viry a jim podobná poškození jabloní dle standardů EPPO.	7
Tabulka 2. Optimalizované specifické primery pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR.	36
Tabulka 3. Optimalizované specifické primery pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV pomocí metody qRT-PCR.	39
Tabulka 4. Hostitelské rostliny testované na přítomnost ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v průběhu let 2013 až 2015.	55
Tabulka 5. Izoláty ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV z jabloní, které byly vybrány na sekvenaci.	56
Tabulka 6. Primery použité při přípravě vybraných vzorků na sekvenaci.	58
Tabulka 7. Izoláty ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV z databáze NCBI.	59
Tabulka 8. Procentuální spolehlivost detekčních metod (ELISA, RT-PCR, qRT-PCR).	64
Tabulka 9. Grafické znázornění spolehlivosti detekčních metod (ELISA, RT-PCR, qRT-PCR).	65
Tabulka 10. Relativní kvantifikace ApMV metodami DASI-ELISA a RT-PCR.	68
Tabulka 11. Absolutní kvantifikace ApMV metodou qRT-PCR.	69
Tabulka 12. Relativní kvantifikace ASGV metodami DAS-ELISA a RT-PCR.	71
Tabulka 13. Absolutní kvantifikace ASGV metodou qRT-PCR.	72
Tabulka 14. Relativní kvantifikace ASPV metodami DAS-ELISA a RT-PCR.	73
Tabulka 15. Absolutní kvantifikace ASPV metodou qRT-PCR.	74
Tabulka 16. Relativní kvantifikace ACLSV metodou DAS-ELISA a RT-PCR.	76
Tabulka 17. Absolutní kvantifikace ACLSV metodou qRT-PCR.	77
Tabulka 18. Celková míra infekce ApMV, ASGV, ASPV, a ACLSV u testovaných rostlin.	78
Tabulka 19. Celková míra infekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní.	81

Obrázky

Obrázek 1. Test specificity primerů navržených pro účely kvantitativní RT-PCR pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.	39
Obrázek 2. Test integrity izolované celkové RNA.	43
Obrázek 3. Narostlé kolonie bakterií.	47

Obrázek 4. Lokality v Praze a okolí, v nichž byl proveden monitoring ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní.....	53
Obrázek 5. Detekce ASGV a ASPV metodou DAS-ELISA.....	60
Obrázek 6. Detekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR.....	61
Obrázek 7. Detekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou qRT-PCR.....	62
Obrázek 8. Výsledek testu DAS-ELISA při relativní kvantifikaci ASGV a ASPV.....	66
Obrázek 9. Výsledek testu RT-PCR při relativní kvantifikaci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.....	67
Obrázek 10. Lokality s volně rostoucími jabloněmi infikovanými ApMV, ASGV a ASPV..	79

1. Úvod

Virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV), virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) a virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) představují skupinu významných virových patogenů jabloní. Jejich přítomnost byla potvrzena po celém světě, tedy na všech místech, kde jejich hostitelé rostou či se komerčně pěstují. Význam těchto patogenů v rostlinolékařském oboru spočívá zejména v jejich potenciálu způsobit nemalé výnosové ztráty při pěstování jaderovin.

Z výše uvedených důvodů je studium biologických a molekulárních vlastností jabloňových virů velmi opodstatněné, protože jen s dokonalou znalostí všech těchto oblastí je možné regulovat jejich přirozený výskyt a tím snížit vznik možných ztrát. V návaznosti na tyto nové poznatky je následně možný rozvoj nových, případně optimalizace již stávajících detekčních metod. Ty by měly umožnit spolehlivější a citlivější detekci zmíněných virů, a na základě toho by bylo možné udělat opatření k zabránění jejich dalšího šíření.

Z těchto důvodů se jedním z hlavních cílů předkládané práce stala optimalizace metody real-time RT-PCR, která by umožnila spolehlivou a citlivou detekci všech studovaných virů a zároveň by mohla být použita i pro jejich kvantifikaci v hostitelských rostlinách, což by mohlo umožnit hlubší poznání biologie těchto patogenů. V rámci této práce byla nově optimalizovaná metoda také porovnávána s konvenčními technikami (RT-PCR a DAS/DASI-ELISA), aby bylo možné posoudit její spolehlivost a případně vyvodit určitá doporučení pro zemědělskou praxi.

Nedílnou součástí předkládané práce je i monitoring výskytu studovaných virových patogenů na našem území u planých i kulturně pěstovaných jabloní a také studium molekulární variability získaných izolátů jednotlivých virů.

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

Hlavní vědeckou hypotézou předkládané práce byl předpoklad, že distribuce viru mozaiky jabloně, viru žlábkovitosti kmene jabloně, viru vrásčitosti kmene jabloně a viru chlorotické skvrnitosti listů jabloně se v různých rostlinných orgánech jabloní liší a zároveň dochází i k fluktuaci titru virů v rostlinách v průběhu celého roku.

Dílní hypotézou byl předpoklad, že hostitelské spektrum sledovaných virů je podstatně širší, než se do dnešní doby předpokládalo, avšak jejich množství v těchto rostlinách je natolik nízké, že znemožňuje jejich detekci pomocí běžně používaných sérologických a molekulárně genetických technik.

Hlavním cílem práce byla detekce a kvantifikace viru mozaiky jabloně, viru žlábkovitosti kmene jabloně, viru vrásčitosti kmene jabloně a viru chlorotické skvrnitosti listů jabloně v rostlině pomocí několika detekčních technik, jmenovitě pomocí metody kvantitativního RT-PCR (qRT-PCR), dále za využití konvenční metody RT-PCR a pomocí sérologických metod DAS/DASI-ELISA.

Dalšími cíli byly:

- monitoring výskytu ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV na našem území, a to u kulturně pěstovaných i planých rostlin
- studium molekulární variability u izolátů ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.

3. Literární rešerše

3.1. Významné viry jabloní

Podle evropských standardů na ochranu rostlin je v současnosti popsáno devět virů a jim podobných agens, fytoplazem a viroidů, kterým by měla být věnována pozornost a jejich výskyt na jabloních pěstovaných v sadech by měl být pravidelně monitorován (tab. 1). Mezi významné viry jabloní patří virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV), virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) a virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) (Anonym 3, 1999). Zmíněné viry se často vyskytují ve směsných infekcích (Mink, 1989) nejenom spolu, ale i s dalšími viry, např. s virem nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) a s virem zakrslosti slivoně (*Prunus dwarf virus*, PDV) (Petrzik a Lenz, 2002).

Tabulka 1. Významné viry a jim podobná poškození jabloní dle standardů EPPO.

Název patogena/choroby	Zkratka	Typ patogena
Virus mozaiky jabloně (<i>Apple mosaic virus</i>)	ApMV	virus
Virus žlábkovitosti kmene jabloně (<i>Apple stem grooving virus</i>)	ASGV	
Virus vrásčitosti kmene jabloně (<i>Apple stem pitting virus</i>)	ASPV	
Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>)	ACLSV	
Apple scar skin viroid	ASSVd	viroid
Proliferace jabloně (<i>Apple proliferation phytoplasma</i>)	AP	fytoplazma
Rubbery wood, flat limb	-	virům podobné organismy
Horseshoe wound	-	
Poškození plodů: chat fruit, green crinkle, bumpy fruit of Ben Davis, rough skin, star crack, russet ring, russet wart	-	

3.1.1. Virus mozaiky jabloně

Virus mozaiky jabloně je celosvětově rozšířený virus s velice širokým hostitelským spektrem (Fulton, 1972). Patogen byl pojmenován po příznacích, které způsobuje na jabloni, prvním hostiteli, na němž byl popsán (Brandford a Joly, 1933).

3.1.1.1. Klasifikace viru

ApMV je řazen do podskupiny III rodu *Ilarvirus* spolu s PNRSV, *Blueberry shock virus* (BIShV) a s *Humulus japonicus latent virus* (HJLV) (Lee *et al.*, 2002). Rod *Ilarvirus* obsahuje 19 virových druhů, které jsou rozděleny do sedmi hlavních podskupin (I-VII) na základě jejich sérologických vlastností (van Regenmortel *et al.*, 2000; Shiel a Berger, 2000). Ilarviry se řadí do čeledi *Bromoviridae* společně s pěti dalšími rody (*Alfamovirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus* a *Oleavirus*), které jsou rozčleněny na základě společných biologických vlastností (Anonym 5, 2014).

3.1.1.2. Organizace genomu viru

ApMV je izometrický virus ikosahedrálního tvaru s rozměry částic okolo 25 nm (Fulton, 1967; Gotlieb a Berbee, 1973; Hunter *et al.*, 1959). Jedná se o vícesložkový virus a pro vznik infekce je nutné, aby všechny části viru byly přítomné v rostlině.

Genom viru je složen z pozitivně orientované jednovláčenné molekuly RNA, která je rozdělena do tří genomických RNA (RNA 1, RNA 2 a RNA 3) a jedné subgenomové RNA (RNA 4) (Ribicki, 1995; Bol, 1999). RNA 1 a RNA 2 kódují geny pro replikaci viru v hostitelské buňce (Shiel a Berger, 2000). RNA 1 je větší a obsahuje 3476 nukleotidů (nt), které kódují jeden otevřený čtecí rámec (open read frame, ORF) kódující polypeptid o 1046 aminokyselinách (aa) a o molekulární hmotnosti (Mr) 118416. Pravděpodobně se jedná o gen metyltransferázy a helikázy (Shiel a Berger, 2000). RNA 2 je dlouhá 2979 nt a také obsahuje jeden ORF, který kóduje peptid o velikosti 875 aa a o molekulové hmotnosti (Mr) 99866 (Shiel a Berger, 2000). RNA 2 pravděpodobně kóduje gen RNA dependentní RNA polymerázy (Buck, 1997). RNA 3 je velká 2056 nt a obsahuje dva ORF, které kódují pohybový (movement protein, MP) a obalový (coat protein, CP) protein. První ORF je složen z 861 nt a kóduje peptid o velikosti 286 aa, který představuje MP (Shiel *et al.*, 1995). MP hraje roli při pohybu viru z buňky do buňky a je translatován přímo z RNA 3 (Alrefai *et al.*,

1994). Druhý ORF je dlouhý 654 až 669 nt a kóduje peptid o velikosti 218 až 223 aa (Petrzik a Lenz, 2002), který vytváří CP, jenž je translatován skrze subgenomickou mRNA (RNA 4), která pochází z RNA 3 (Alrefai *et al.*, 1994). CP tvoří obal všech tří genomových částí viru a zároveň hraje roli v mnoha krocích replikace viru a v iniciaci a šíření virové infekce (Jaspars, 1985; Ansel-McKinney a Gehrke, 1998; Bol, 1999).

V současnosti je pozornost věnována výzkumu sekvenční variability CP izolátů ApMV. V minulých studiích byly identifikovány izoláty s inzercí 6 až 15 nukleotidů, což by mohlo mít za následek vytvoření stabilní sekundární struktury se třemi vlásenkami. Tato inserce byla zatím potvrzena u izolátů jabloní a hrušní, které byly porovnávány s izoláty rodu *Prunus* (Petrzik, 2005; Petrzik a Lenz, 2002). V rámci fylogenetických studií se neprokázalo, že by heterogenita izolátů mohla souviset s geografickým původem izolátů (Lee *et al.*, 2002; Thokchom *et al.*, 2009). Pravděpodobnější je proto rozřazení izolátů dle hostitelských rostlin, kde by jednu skupinu tvořily již zmíněné jádroviny a druhou ostatní hostitelské rostliny (např. *Prunus* spp., *Humulus lupulus*) (Grimová *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2002; Thokchom *et al.*, 2009).

3.1.1.3. Hostitelské rostliny

ApMV byl identifikován na dřevinných i bylinných hostitelích. Mezi ovocnářsky významné hostitele patří jabloně (*Malus domestica*), hrušně (*Pyrus communis*), slivoně (*Prunus domestica*), meruňky (*Prunus armeniaca*), broskvoně (*Prunus persiaca*), třešně (*Prunus avium*), mandloně (*Prunus amygdalus*), jahodníky (*Fragaria* sp.), maliníky (*Rubus idaeus*), ostružiníky (*Rubus occidentalis*), červené rybízy (*Ribes rubrum*) a lísky (*Coryllus avellana*) (Anonym 1, 2003). Dalšími náchylnými druhy jsou chmel (*Humulus lupulus*), růže (*Rosa* sp.) a různé druhy z rodu *Prunus* např. *P. cerasifera*, *P. instititia*, *P. mahaleb*, *P. salicina*, *P. serulata*, *P. triloba*, *P. cerasus* (Brunt *et al.*, 1996; Neméth, 1986; Sweet, 1980). Virus byl také nalezen na břízách (*Betula pendula*, *B. papyrifera*, *B. alleghaniensis*), jírovcích (*Aesculus hippocastanum*, *A. x carnea*), jeřábech (*Sorbus aucuparia*), trnkách (*Prunus spinosa*) a hlozích (*Crataegus* sp.) (Fulton, 1972; Gotlieb a Berbee, 1973; Polák a Zieglerová, 1997). Mezi potenciální hostitele patří kdouloně (*Chaenomeles* sp.) a mišpule (*Mespilus* sp.), v nichž je ApMV pravděpodobně přítomný ve velice nízkých koncentracích (Desvignes *et al.*, 1999). ApMV byl také detekován ve volně rostoucích plevelných rostlinách

v lískovém sadu, v němž byla potvrzena přítomnost patogena u stromů. Mezi plevely, na nichž byla přítomnost viru potvrzena, patří vochlíce (*Scandix* sp.), pelyněk černobýl (*Artemisia vulgaris*), zvonek (*Campanula* sp.), šalvěj sporýšová (*Salvia verbenaca*), konopice (*Galeopsis* sp.), černohlávek (*Prunella* sp.) a plamének plotní (*Clemantis vitalba*) (Arli-Sokmen *et al.*, 2005).

3.1.1.4. Přenos viru

Přenos viru je možný vegetativním množením z infikovaných rostlin na zdravé a také mechanickou inokulací. Přestože má virus velice široké spektrum hostitelských rostlin není znám žádný vektor, který by ho přenášel (Fulton, 1952;). Přenos ApMV byl pozorován také v případě srůstu kořenů ve školkách ovocných dřevin (Hunter *et al.*, 1958, Dhingra, 1972). Stejným způsobem pravděpodobně dochází i k přenosu na plevelné rostliny v sadech (Arli-Sokmen *et al.*, 2005).

Cameron a Thompson (1986) ve své práci uvedli, že přenos ApMV semenem lze pozorovat na lískách, kdy se na novém porostu semenáčů objevily příznaky ApMV. Virus byl také detekován v embryu a endospermu nezralého semene u jírovců, ale po vyžrání už se virus nepodařilo detekovat (Sweet a Barbara, 1979). Aramburu a Rovira (2000) se zabývali přenosem viru pylem u lísek. Přenos semenem a pylem však stále zůstává nepotvrzen (Petrzik, 2005).

Při pokusech na chmelu byl prokázán přenos viru na čepeli nože, který byl předtím v kontaktu s infikovanou rostlinou, případně kontaktem listů chmelových rostlin (Pethybridge, 2002).

3.1.1.5. Příznaky virové infekce

ApMV je původcem mozaiky (žlutých nepravidelných skvrn) na listech, ale může se projevit i nekrózou nebo být latentní (Neméth, 1986). Příznaky viru se liší u různých virových kmenů nejen svou intenzitou, ale i konkrétním projevem. Rozdíly jsou i mezi jednotlivými hostitelskými rostlinami. Příznaky se většinou neprojeví na celé rostlině, ale náhodně na některých větvích či listech (Paunovic *et al.*, 2011).

Na jabloních se nejčastěji objevují typické mozaikové skvrny, ale plody jsou bezpříznakové (Petrzik a Lenz, 2011). U hrušně je infekce zcela bezpříznaková (Petrzik a

Lenz, 2002), zatímco na peckovinách se většinou virus projevuje kroužkovitostí a proužkovitostí (Canova, 1960; Dhingra, 1972; Diekmann a Putter, 1996; Ellenberger, 1962; Neméth, 1986; Posnette a Ellenberger, 1957). U lísek bývají příznaky obdobné jako u jabloní (Akbas *et al.*, 2004).

K různým projevům viru dochází i u jednotlivých kultivarů, většinou v souvislosti s citlivostí dané odrůdy na ApMV (Anonym 2, 1991). Vliv na výskyt příznaků má i vegetační období a průběh počasí daného roku. Symptomy způsobené ApMV bývají nejvýraznější od konce jara do začátku léta. V pozdějších obdobích roku se vytrácejí (Lee *et al.*, 2002).

3.1.1.6. Rozšíření a ekonomický význam viru

ApMV je celosvětově rozšířený virus, který lze nalézt na planých, ale i kulturně pěstovaných rostlinách (Paunovic *et al.*, 2011). Jak již bylo zmíněno, virus se často vyskytuje ve směsných infekcích, na peckovinách spolu s PNRSV a PDV, u jádrovin s ASPV, ASGV a ACLSV (Petrzik a Lenz, 2002).

V České republice se uvádí, že více než 17 % jabloní v sadech, je virem infikováno. U starších sadů může být napadeno i více než 50 % stromů (Svoboda a Polák, 2010). U hrušní nebyl takto rozsáhlý výzkum u nás nikdy proveden, ale při testování 16 hrušní bylo nalezeno 13 pozitivních (Petrzik a Lenz, 2002). V případě peckovin byla na našem území realizována studie u planě rostoucích rostlin. Otestováno bylo celkem 162 myrobalánů, 86 slivoní, 56 trnek a 55 stromů třešní a višní. Infekce ApMV byla potvrzena pouze na několika stromech, konkrétně se jednalo o jeden myrobalán a tři slivoně (Polák, 2007). Virus byl také detekován na devíti ze 72 testovaných stromů volně rostoucích jírovců a na pěti z 29 testovaných jeřábů (Polák a Zieglerová, 1997). Dále byla provedena rozsáhlá studie týkající se výskytu ApMV na různých kultivarech a klonech chmelu pěstovaného na našem území. Přítomnost viru byla potvrzena na kultivarech Zlatan (10 pozitivních/17 testovaných), Žatecký Červeňák (7/7), Aromat (3/4), Sirem (3/3), Blato (7/7), Lučan (3/3), Petham Golding (8/20), Early Prolific (3/10), Sacramento (5/10), Cobbs Golding (1/2), Early Bird Golding (1/2), Wye Early Bird Golding (1/2), Atlas (1/1), Hüller Bitterer (1/1), Northern Brewer (3/3), Brewers Gold (1/1), Smooth Cone (1/1), Shinshu Wase (1/1), Fuggle N (4/4) a na Osvaldově klonu (35/58) (Polák a Svoboda, 1989; Svoboda, 1993).

Rozsáhlé studie zabývající se výskytem viru na jádrovinnách byly realizovány také v zahraničí. V Lotyšsku byla přítomnost ApMV prokázána na 22 % z 50 testovaných jabloní a na 21 % z 36 testovaných hrušní (Pupola *et al.*, 2011). V Rumunsku byl virus detekován pouze na jedné jabloni ze 17 testovaných stromů (Popescu *et al.*, 2004). Obdobně nízký výskyt ApMV byl potvrzen také v Albánii, kde bylo infikováno 0,7 % ze 140 testovaných stromů jabloní (Myrta *et al.*, 2004). V Bosně a Hercegovině se přítomnost ApMV na 65 testovaných jabloních a 50 hrušních nepotvrdila (Lolic *et al.*, 2010). Naopak v Itálii bylo virem infikováno 77 % testovaných hrušní (Di Terlizzi *et al.*, 1992). V Řecku se v jabloňových sadech míra infekce ApMV pohybuje mezi 2,7 až 10,6 % (Varveri a Bem, 1995). V Maroku byl virus detekován na čtyřech ze 100 studovaných jabloní (Afechtal *et al.*, 2010). V Tunisku byla přítomnost ApMV potvrzena na 15 % ze 111 testovaných stromů jabloní a na 11 % ze 106 testovaných hrušní (Mahfoudhi *et al.*, 2013). V případě Turecka se výskyt viru na jabloních velice lišil v jednotlivých regionech. Infekce ApMV se pohybovala v rozmezí 1-68 % (Akbas a Ilhan, 2005; Caglayan *et al.*, 2006; Dursunoglu a Ertunc, 2008; Elibuyuk a Erdiller, 1998; Korkmaz *et al.*, 2013; Uzunogullari a Ilbagi, 2009). Dále byl monitoring na jabloních proveden v Sýrii a infekce virem byla prokázána pouze u 0,2 % z 1077 studovaných stromů (Ismaeil *et al.*, 2006). V Jordánsku byla přítomnost ApMV potvrzena u 16 stromů z 1565 testovaných jabloní (Salem *et al.*, 2005). V Indii se rozšíření viru na jabloních lišilo dle toho, ve kterém regionu byl monitoring proveden. Thokchom *et al.* (2009) ve své práci uvádí pouze 13 infikovaných stromů ze 198 testovaných, zatímco Lakshmi *et al.* (2011) prokázal infekci ApMV na 26 % ze 78 testovaných stromů.

Rozšíření ApMV bylo studováno také u peckovin. V Itálii byla přítomnost ApMV prokázána u 21 % z 323 slivoní, 20 % z 370 broskvoní, 2 % z 1397 meruněk a u 45 % mandloní (Di Terlizzi, 1998). Ve Španělsku byl virus detekován na 1-3 % meruněk, 2-7 % slivoní, 4-15 % broskvoní, 3 % třešní a na 14-17 % mandloní (Dominguez *et al.*, 1998; Llacer *et al.*, 1986; Myrta *et al.*, 2003; Pallas *et al.*, 1998). V Turecku byla infekce ApMV potvrzena na 22 % trnek a na 19 z 22 testovaných slivoní (Akbas a Degirmenci, 2010; Ilbagi *et al.*, 2008) V rámci monitoringu provedeného v Alžírsku byl výskyt viru prokázán u 1 % meruněk (testováno 109 stromů), 2 % broskvoní (91), 2 % slivoní (98), 2 % třešní (64) a 3 % myrobalánů (24) (Rouag *et al.*, 2008).

Zdravotní stav lísek byl studován ve Španělsku, Polsku a Turecku. Ve Španělsku byla infekce ApMV prokázána u 97 % vzorků z 320 testovaných lísek (Aramburu a Rovira, 2000). V Turecku se výsledky výrazně lišily v rámci dvou provedených studií. Akbas *et al.* (2004) uvádí, že 73 % ze 150 testovaných lísek bylo ApMV infikováno, zatímco ve studii Akbase a Degirmenciho (2009) byla přítomnost viru potvrzena u 13,6 % z 1465 studovaných lísek. V Polsku byl virus detekován pouze na vzorcích z kultivaru Negret a na jednom stromu klonu 104E z celkem 27 testovaných kultivarů a klonů lísek (Kobylko *et al.*, 2005).

Studie zabývající se rozšířením ApMV na rostlinách chmele byly realizovány v USA. V dříve provedené studii byla infekce virem prokázána pouze na 1 % rostlin (Klein *et al.*, 1995). V dalším monitoringu obdobného rozsahu byl virus detekován na 29 % z 200 testovaných rostlin (Postman *et al.*, 2005). V USA byl virus detekován také na volně rostoucích břízách (Gotlieb a Berbee, 1973). Také v Německu byla přítomnost ApMV na čtyřech planě rostoucích břízách potvrzena (Gruntzig *et al.*, 1996).

Přesné informace o celkových ekonomických ztrátách způsobených ApMV nejsou známy. Významným faktorem je však snížení výnosu, které infekce způsobí. U jabloní jsou uváděny ztráty na výnosu ovoce 30 až 50 % (Thokchom *et al.*, 2009). U chmelu se ztráty pohybují okolo 20 až 30 % (Gent, 2013), zatímco u lísek je u virózních stromů ztráta na výnosu ořechů přibližně 40 % (Postman, 2002).

3.1.2. Virus žlábkovitosti kmene jabloně

Virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV) je celosvětově rozšířený virus, který je většinou původcem latentní infekce především u ovocných dřevin z čeledi *Rosaceae* (Neméth, 1986). Poprvé byl popsán na jabloni (*Malus sylvestris*) cv. Virginia crab, kde byl původcem odumírání stromů a nekrotizace při srůstání roubů s podnoží (Lister *et al.*, 1965).

3.1.2.1. Klasifikace viru

Virus je řazen do rodu *Capillovirus* spolu s *Cherry virus A* (CVA), a je jejím typovým představitelem. Čeleď *Betaflexiviridae* zahrnuje kromě rodu *Capillovirus* dalších 6 rodů rostlinných virů (*Carlavirus*, *Citrovirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, *Trichovirus* a *Vitivirus*) a skupinu 9 nezařazených virů. Řád *Tymovirales*, jehož členy jsou kromě čeledi *Betaflexiviridae* i čeledi *Alphaflexiviridae*, *Cammaflexiviridae* a *Tymoviridae*, zahrnuje především rostlinné viry, ale někteří zástupci patří mezi mykoviry (Anonym 5, 2014).

Dnes již nepoužívaným synonymem pro ASGV je *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), který byl popsán na jiných hostitelích než ASGV a byl považován za samostatný druh. Až sekvenací genomů virů bylo potvrzeno, že se jedná o stejné patogeny, které byly na různých hostitelích různě pojmenovávány (Yoshikawa *et al.*, 1996; Magome *et al.*, 1997).

3.1.2.2. Organizace genomu viru

ASGV je vláknitý lineární virus s částicemi o velikosti 600 – 700 nm x 12 nm, který má spirálovitý tvar α -helixu (Lister a Bar-Joseph, 1981). Genom je tvořen pozitivně orientovanou jednovláknitou RNA, která je složena z 6496 nt a na 3' konci je polyadenylována (Yoshikawa *et al.*, 1992). RNA obsahuje dva překrývající se ORF (ORF 1 a 2), které kódují virové proteiny. ORF 1 kóduje polyprotein o 241 – 242 kDa (2105 aa), který v sobě zahrnuje geny pro methyltransferázu, helikázu, papainovou proteázu a RNA dependentní RNA polymerázu a na C-konci je kódován obalový protein (coat protein, CP) o 27 kDa (Yoshikawa *et al.*, 1992; Ohira *et al.*, 1995). V ORF 1 se vyskytuje také úsek, kde není kódován žádný produkt. Tato část genomu je variabilní mezi různými izoláty viru, a proto je označována jako *V-region* (Magome *et al.*, 1997). ORF 2, který je vložen do ORF 1 v jiném čtecím rámci, kóduje 36 kDa (320 aa) velký pohybový protein (movement protein, MP) a virovou proteázu (Yoshikawa *et al.*, 1992; Magome *et al.*, 1997). Virová strategie exprese genů tohoto viru

využívá jak tvorby polyproteinu, pro ORF 2 a větší část ORF 1, tak subgenomické RNA pro CP (Hirata *et al.*, 2003; Tatineni *et al.*, 2009).

3.1.2.3. Hostitelské rostliny

Virus byl do dnešní doby detekován na jabloni (*Malus* sp.), hrušni (*Pyrus communis*, *P. pyryfolia*), meruňce (*Prunus armeniaca*), třešni (*Prunus avium*), citrusech (*Citrus* sp.) a aktinídií (*Actinidia* sp.) (Lister, 1970; Neméth, 1986; Sawamura *et al.*, 1988; Yoshikawa *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1990; Kinard *et al.*, 1996; Lovisolo *et al.*, 2003; Clover *et al.*, 2003). Byla popsána i přirozená infekce virem na okrasných rostlinách, kterými jsou lilie (*Lilium* sp.) a bambus nebeský (*Nandina domestica*) (Inouye *et al.*, 1979; Tang *et al.*, 2010).

3.1.2.4. Přenos viru

ASGV je přenosný vegetativním množením infikovaných rostlin a také mechanickou inokulací. Žádný organismus nebyl zatím potvrzen jako přenašeč viru a ani přenos pylem nebyl prokázán. U některých bylinných hostitelů (*Lilium* sp., *Chenopodium quinoa*) byl potvrzen přenos viru semenem (Inouye *et al.*, 1979), který byl také popsán u *Malus platycarpa* (Van der Meer, 1976).

3.1.2.5. Příznaky virové infekce

Na většině odrůd jabloní je virová infekce bezpříznaková (Neméth, 1986). U citlivých odrůd jabloní může docházet k poškození xylému, které se projevuje rýhami ve dřevě a nekrotizací lýka. Díky tomu je oslabena celá rostlina a snižuje se růst nových výhonů (Nickel *et al.*, 2004). Mezi citlivé odrůdy patří např. kultivar Virginia crab, u kterého dochází k odumírání a k nekrotizaci, pokud je na něj naroubován nebo naočkován infikovaný kultivar (Desvignes *et al.*, 1999; Yanase *et al.*, 1990). U citrusů virus způsobuje nejčastěji poškození při srůstu roubů a oček s podnoží, kde dochází k nekrotizaci a následně k oslabení celých rostlin (Miyakawa a Ito, 2000). Na mandarinkách se virus může projevit kroužkovitostí plodů a listů (Lovisolo *et al.*, 2003). Podobné příznaky bývají i na listech aktinídie, kde se objevuje i chloróza (Clover *et al.*, 2003).

3.1.2.6. Rozšíření a ekonomický význam viru

ASGV je latentní virus, jehož výskyt je pravděpodobně celosvětový. Větší výskyt viru lze pozorovat v oblastech pěstování jabloní. Lister (1970, 1996) uvádí, že přítomnost viru byla potvrzena v Austrálii, Číně, Indii, Japonsku, Nizozemsku, Portugalsku, Itálii, Velké Británii, Severní Americe a na Novém Zélandu. Infekce ASGV byla na čeledi *Rosaceae* zdokumentována také v Brazílii (Betti *et al.*, 1995). Na jadrovinách byl virus zkoumán v mnoha zemích např. v Polsku, Lotyšsku, Bosně a Hercegovině, Jordánsku, Sýrii, Egyptě a Maroku (Afechtal *et al.*, 2010; Al-Jerb *et al.*, 2005; Lolic *et al.*, 2010; Paduch-Cichal a Tomala, 2007; Pupola *et al.*, 2011; Salem *et al.*, 2005; Youssef *et al.*, 2010).

Polák a Zieglerová (2001) uvádějí, že rozšíření viru na našem území je značné. V rámci monitoringu byl výskyt viru potvrzen u 44 % ze 420 testovaných stromů jabloní ze sadů a školek (Kundu, 2003b). V další studii provedené v České republice na jabloních bylo 67 % ze 40 sledovaných stromů infikováno ASGV (Kundu *et al.*, 2003). Tato data potvrzuje také Svoboda a Polák (2010), kteří uvádějí, že infekce ASGV na stromech v jabloňových sadech dosahuje v ČR více než 50 %.

V Polsku byl virus zachycen na přibližně 40 % testovaných jabloní v produkčních sadech (Paduch-Cichal a Tomala, 2007). V Bosně a Hercegovině byla provedena detekce viru v menším rozsahu a virus byl detekován v 10 z 30 testovaných jabloní a v 11 z 16 testovaných hrušní (Lolic *et al.*, 2010). Také v Číně byl potvrzen vysoký výskyt viru a to na 67 % jabloní pěstovaných v sadech v oblasti Shaanxi (Liu *et al.*, 2013). Naopak v Jordánsku bylo nalezeno pouze 4,6 % infikovaných jadrovin z 1565 testovaných rostlin (1393 jabloní, 149 hrušní, 23 kdouloní) (Salem *et al.*, 2005). V Maroku byla infekce detekována také v menším rozsahu. Ze 70 testovaných jabloní bylo pozitivních na ASGV pouze 8 a z 30 testovaných hrušní bylo ASGV infikováno pouze 6 stromů (Afechtal *et al.*, 2010). V Egyptě byl monitoring proveden v 9 sadech jadrovin a virus byl detekován na 50 jabloních z 224 testovaných a u hrušní se přítomnost ASGV potvrdila v 22 vzorcích ze 196 testovaných (Youssef *et al.*, 2010). V Sýrii byl virus potvrzen na 24 (3,2 %) jabloních ze 754 testovaných a ASGV nebyl nalezen na hrušních a kdouloních testovaných v této oblasti (Al-Jerb *et al.*, 2005). Na citrusech (např. mandarinkách a pomerančích) v Japonsku byl virus detekován pouze na 5 % vzorků z 217 testovaných (Ito *et al.*, 2002).

Zhodnotit ekonomický dopad infekce ASGV je složité. Problémový je výskyt viru ve školkách, zvláště u okrasných jabloní (*Malus* sp.), kde může dojít k úhynu, ale i jen k estetickému znehodnocení stromků při roubování a očkování. Podobné problémy byly pozorovány i při pěstování citrusů, kde při infekci ASGV může dojít k poškozením při nekompatibilitě podnože a roubu (Tahakara *et al.*, 1988).

3.1.3. Virus vrásčitosti kmene jabloně

Virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) je jedním z nejvýznamnějších latentních virů napadajících jabloně a hrušně. Vyskytuje se celosvětově v produkčních sadech jaderovin a může být původcem významných ekonomických ztrát.

3.1.3.1. Klasifikace viru

ASPV je řazen do rodu *Foveavirus* spolu s dalšími pěti viry (např. latentním virem meruňky -*Apricot latent virus*, ApLV; virem chlorotické strakatosti broskvoně – *Peach chlorotic mottle virus*, PCMoV a virem mělké vrásčitosti révy – *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, GRSPaV) a je jejím typovým představitelem. Tento rod stejně jako již zmiňovaný rod *Capillovirus* patří do čeledi *Betaflexiviridae*, která je zařazena do řádu *Tymovirales* (Anonym 5, 2014).

3.1.3.2. Organizace genomu viru

ASPV je vláknitý lineární virus s helikální strukturou a částicemi o velikosti přibližně 12-15 nm na šířku a 800 nm na délku. Jeho genom je tvořen jednovláknennou pozitivně orientovanou RNA o délce 9 332 nt, jejíž 3' konec je polyadenylován (Jelkmann, 1994; Koganezawa a Yanase, 1990). Genom viru tvoří pět otevřených čtecích rámců (ORF 1, 2, 3, 4 a 5) a také 135 nt dlouhá variabilní nekódující oblast před polyA koncem. ORF 1 kóduje proteiny zodpovědné za replikaci viru, a to metyltransferázu, helikázu a RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp). V ORF 2, 3 a 4 je kódován trojitý blok genů nutných pro pohyb viru v rostlině, tzv. pohybový protein (Martelli *et al.*, 2007). Jedná se o jeden větší polypeptid, který tvoří helikázu a dva menší peptidy představující membránové přenašeče. ORF 5 kóduje obalový protein viru o velikosti 42 – 44 kDa (Jelkmann, 1994). Virus se celkově vyznačuje velkou variabilitou genomu (Yoshikawa *et al.*, 2001). Exprese genů probíhá na 5'konci přímo a zbylé virové geny jsou exprimovány pomocí subgenomických RNA (Martelli a Jelkmann, 1998).

3.1.3.3. Hostitelské rostliny

ASPV byl zatím popsán jen na úzkém okruhu hostitelských rostlin. Mezi ovocnářsky významné hostitele patří jabloně (*Malus* sp.) a hrušně (*Pyrus* sp.). Mezi další přirozené

hostitele, na nichž byl virus zachycen, patří kdouloně (*Cydonia oblonga*), hlohy (*Crateagus* sp.) a jeřáby (*Sorbus* sp.) (Neméth, 1986).

3.1.3.4. Přenos viru

Virus se nejčastěji přenáší vegetativním množením a kontaktem kořenů (Jelkmann a Paunovic, 2011). Zatím nebyl nalezen žádný vektor, který by patogena přenášel a ani přenos semenem a pylem nebyl potvrzen. S určitými obtížemi lze virus z jabloní a hrušní přenést mechanicky na náchylné bylinné hostitele a zpět na přirozené hostitele (Neméth, 1986; Van der Meer, 1986; Leone *et al.*, 1995). Virus získaný z kdouloně se zatím mechanicky přenést na bylinné hostitele nepodařilo (Paunovic a Rankovic, 1998).

3.1.3.5. Příznaky virové infekce

U komerčně pěstovaných odrůd jabloní a hrušní je infekce ASPV většinou bezpříznaková. U hrušní se mohou příznaky na těchto odrůdách objevit v prvních letech po výsadbě a následně vymizí. Symptomy se obvykle projevují na citlivých a indikátorových rostlinách (Desvignes *et al.*, 1999). U jabloní dochází k vrásčitosti kmene a větví, případně epinastii listů. Intenzita příznaků se liší dle konkrétní odrůdy (Koganezawa a Yanase, 1990). U hrušní se infekce ASPV projevuje chlorotickými skvrnami podél žilek listů, které se objevují na jaře a nejviditelnějšími se stávají v průběhu léta. U některých odrůd hrušní se jedná spíše o načervenalé či nekrotizující skvrny. Na plodech hrušní se infekce může projevit povrchovými deformacemi, které jsou tvořeny sklerenchymatickými buňkami, jež vyplňují dužninu plodu (Cameron, 1989). V případě kdouloní patří mezi typické příznaky infekce ASPV vznik sazovitých skvrn kruhovitého nebo podlouhlého tvaru nacházejících se podél žilek listů a rozvoj nažloutlých skvrn na listech. U plodů dochází ke zmenšení a povrchovým deformacím (Desvignes, 1971; Paunovic, 1995).

3.1.3.6. Rozšíření a ekonomický význam viru

ASPV je rozšířen celosvětově a lze ho nalézt všude tam, kde se pěstují jabloně, hrušně a kdouloně.

V České republice byl proveden rozsáhlý výzkum výskytu ASPV v jabloňových sadech a školkách. Výskyt ASPV byl potvrzen u 27,86 % vzorků, tedy u 117 jabloní ze 420

testovaných (Kundu, 2003b). Podobný monitoring výskytu viru na jádrovínách byl proveden i v dalších zemích např. Lotyšsku, Řecku, Turecku, Maroku a Egyptě (Afechtal *et al.*, 2010; Mathioudakis *et al.*, 2010; Pupola *et al.*, 2011; Sertkaya, 2010; Youssef *et al.*, 2010). V Řecku byla potvrzena vysoká míra infekce ASPV na jabloních, bylo napadeno 123 ze 134 testovaných stromů. U hrušní byl virus detekován v menší míře, a to u 57 ze 111 testovaných rostlin (Mathioudakis *et al.*, 2010). V Bosně a Hercegovině byly zaznamenány podobné výsledky. Větší výskyt ASPV byl u jabloní, kde byl virus nalezen ve 45 z 65 testovaných stromů a u hrušní byl virus detekován pouze u 11 z 50 testovaných stromů (Lolic *et al.*, 2010). Nižší výskyt viru byl potvrzen v Egyptě, kde byl virus nalezen u 30 z 224 testovaných jabloní a u 25 ze 196 testovaných hrušní (Youssef *et al.*, 2010). Obdobné výsledky byly získány i v Maroku, kde bylo infikováno ASGV 18 ze 70 jabloní a 8 z 30 sledovaných hrušní (Afechtal *et al.*, 2010). Naopak v Turecku byl u hrušní zaznamenán relativně vysoký výskyt viru. ASGV byl potvrzen u 60 % stromů ze 100 testovaných (Sertkaya, 2010). V Tunisku byl monitoring zaměřen také na kulturně pěstované hrušně a virus byl potvrzen u 18 ze 44 testovaných stromů (Mahfoudhi *et al.*, 2011).

Zhodnotit ekonomický dopad infekce ASPV je složité. V případě hrušní a kdouloní infikovaných ASPV může u citlivých odrůd dojít k přímému poškození plodů a tím dojde ke snížení výnosu, ale v jednotlivých letech se ztráty liší (18 - 94 %) (Paunovic, 1995; Thomsen, 1989). Virová infekce má vliv i na samotný růst stromů a tím může dojít k ovlivnění ovocnářské produkce. U napadených stromů může dojít ke snížení růstu výhonů o 29 – 55 % v průběhu vegetace. Dochází však k rozdílům mezi jednotlivými ročníky a také odrůdami (Cropley a Posnette, 1973; Thomsen, 1975). U hrušní dochází k 5% snížení tvorby pupenů, k 15 – 50% snížení nárůstu nadzemní části v průběhu vegetace a k 10 – 15% ztrátě vitality stromů ve školkách (Lemoine a Michelesi, 1995).

3.1.4. Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně

Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) je velice variabilní virus v rámci symptomatologie, ale většinou je jeho infekce latentní. Výskyt viru byl do dnešní doby potvrzen na jádrovinách i peckovínách. Poprvé byl virus popsán ve Velké Británii na jabloních při použití indikátorové rostliny *Malus platycarpa* (Luckwill a Campbell, 1959), ale pojmenován byl ve stejné době v USA, kde byl virus vyizolován z ruské jabloňové podnože a přenesen na *Malus platycarpa* (Mink a Shay, 1959).

3.1.4.1. Klasifikace viru

ACLSV je typovým představitelem rodu *Trichovirus*, kam je řazen spolu s dalšími šesti viry např. virem mozaiky broskvoně (*Peach mosaic virus*, PMV) a *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, APCLSV. Tento rod patří do čeledi *Betaflexiviridae* spolu s šesti dalšími rody a devíti nezařazenými viry. Čeleď *Betaflexiviridae* je součástí řádu *Tymovirales*, stejně jako čeleď *Alphaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae* a *Tymoviridae* (Anonym 5, 2014).

3.1.4.2. Organizace genomu viru

ACLSV je vláknitý lineární virus o velikosti částic 12 x 720 nm. Jeho genom je tvořen jednovláknennou pozitivně orientovanou RNA o délce přibližně 7 500 nt, která je na 3' konci polyadenylována (Yoshikawa a Takahashi, 1988). Genom viru je rozdělen do tří překrývajících se ORF (ORF 1, 2, 3) (Sato *et al.*, 1993). ORF 1 kóduje polyprotein zodpovědný za replikaci viru o molekulové hmotnosti 217 kDa. V ORF 1 lze rozeznat sekvence typické pro methyltransferázu, helikázu a RNA dependentní RNA polymerázu (German *et al.*, 1990). ORF 2 kóduje MP o velikosti 50 kDa a ORF 3 pro CP o molekulární hmotnosti 22 kDa (German *et al.*, 1990). ORF 1 je exprimována přímo, zatímco ORF 2 a 3 využívají pro přepis strategii subgenomické RNA (German *et al.*, 1992; Candresse *et al.*, 1996). Genom ACLSV je značně variabilní, jak naznačují studie, které byly dosud provedeny u různých izolátů viru (Candresse *et al.*, 1995; Al Rwahnih *et al.*, 2004; Yaegashi *et al.*, 2007). Největší variabilita byla popsána v úseku, kde se překrývá MP s CP. V případě MP byla pozorována variabilita na úrovni proteinů, kde dochází ke změnám jednotlivých aminokyselin (Candresse *et al.*, 1995; German *et al.*, 1997), zatímco CP je z tohoto pohledu konservativnější, ale mění se rozsah jeho elektroforetické pohyblivosti a dochází tedy ke

změnam v sekundární struktuře (Malinowski *et al.*, 1998; Pasquini *et al.*, 1998; Al Rwahnih *et al.*, 2004).

3.1.4.3. Hostitelské rostliny

ACLSV byl popsán převážně na dřevinných hostitelích. Z u nás ovocnářsky významných druhů byl virus detekován na jabloních, hrušních, slivoních, broskvoních, meruňkách, třešních a višních (Giunchedi, 2003; Lister, 1970; Myrta *et al.*, 2003; Neméth, 1986). Z dalších ovocných dřevin ho lze nalézt na mandloních, trnkách, kdouloních a mišpulích. Výskyt ACLSV byl popsán i na planých a okrasných rostlinách z čeledi *Rosaceae* např. hlozích (*Crateagus* sp.) a japonské meruňce (*Prunus mume*) (Spiegel *et al.*, 2005; Sweet, 1980).

3.1.4.4. Přenos viru

Virus je přenášen vegetativním množáním, tedy očkovaním a roubováním (Németh, 1986). ACLSV lze s obtížemi přenést mechanickou inokulací na bylinné hostitele, ale poté je již možné ho přenášet mezi bylinnými hostiteli snáz (Myrta *et al.*, 2011). V současnosti není znám žádný vektor, který by virus přenášel a ani přenos semenem a pylem nebyl zatím potvrzen (Yoshikawa, 2001).

3.1.4.5. Příznaky virové infekce

Infekce ACLSV je většinou bezpříznaková, ale intenzita příznaků a závažnost poškození záleží vždy na konkrétním druhu rostliny a izolátu viru (Németh, 1986). Na většině v současnosti kulturně pěstovaných odrůdách jaderovin je infekce ACLSV bezpříznaková. U některých starších odrůd jabloní a hrušní dochází k tvorbě kruhových žlutých skvrn na listech, případně plodech (Desvignes a Boyé, 1988; Cropley *et al.*, 1963). U nejcitlivějších druhů a odrůd jaderovin bylo popsáno i odumření stromu v případě, že došlo ke vzniku nekrotických skvrn na kmenech a větvích stromu při infekci ACLSV (Yanase 1974; Yanase *et al.*, 1979). U peckovin je infekce rovněž nejčastěji bezpříznaková. Pokud už se příznaky na stromech objeví, bývají přítomné na listech a plodech. U meruňek se příznaky ACLSV objevují nejčastěji a jsou známy jako onemocnění pseudo-šarka, protože dochází ke zmenšení a deformaci plodů, případně ke vzniku žluté kroužkovitosti poblíž listových žilek (Myrta *et al.*,

2003; Desvignes a Boyé, 1988). Obdobné příznaky byly popsány i u broskvoní, třešní a višní, ale vzácně se mohou objevit i na slivoních (Desvignes, 1999; Jelkmann a Kunze, 1995).

3.1.4.6. Rozšíření a ekonomický význam viru

ACLSV je rozšířen celosvětově, především v oblastech pěstování jaderovin a peckovin, kde se šíří díky vegetativnímu množení.

V České republice byl virus detekován téměř ve všech testovaných jabloních (celkem otestováno 72 stromů) a ve 28 ze 126 testovaných hrušní (Polák *et al.*, 1997; Polák a Svoboda, 2006). V Polsku bylo detekováno 63,9 % ACLSV pozitivních jabloní ze 183 testovaných (Paduch-Cichal a Tomala, 2007). V Bosně a Hercegovině byl virus také detekován ve velké míře. Infekce ACLSV byla zaznamenána na 44 z 61 testovaných vzorků jabloní a na 32 z 50 testovaných stromů hrušní (Lolic *et al.*, 2010). Naopak v Litvě byl ACLSV zaznamenán pouze na sedmi ze 422 testovaných jabloní (Stankiene *et al.*, 2012). Monitoring na jabloních a hrušních byl proveden také v Lotyšsku, kde bylo ACLSV infikováno 65 % z 50 testovaných stromů jabloní a 32 % z 36 stromů hrušní (Pupola *et al.*, 2011). V Řecku bylo zaznamenáno obdobné rozšíření ACLSV. Virus byl detekován na 66 % ze 134 testovaných jabloní a na 21 % ze 111 sledovaných hrušní (Mathioudakis *et al.*, 2010). V Maroku byl virus zaznamenán na 26 stromech ze 70 testovaných jabloní a na 19 hrušních z 30 testovaných (Afechtal *et al.*, 2010). V Tunisku byl monitoring proveden na 111 jabloních, 106 hrušních a 31 kdouloních. Infekce ACLSV byla potvrzena na 33 % stromů jabloní a 45 % stromů hrušní, avšak virus nebyl detekován na žádné kdouloni (Mahfoudhi *et al.*, 2011). V Iránu bylo testováno 1078 jabloní, 92 hrušní a 23 kdouloní. I zde nebyla přítomnost viru potvrzena na žádné testované kdouloni, ale ani na žádné ze studovaných hrušní. Virus byl však detekován u 200 stromů jabloní (Keshavarz *et al.*, 2009). V Sýrii byl monitoring proveden na jaderovinách pěstovaných v sadech a výskyt viru byl potvrzen na 186 ze 754 sledovaných jabloní. Přítomnost ACLSV nebyla opět prokázána na hrušních ani kdouloních (Al-Jebr *et al.*, 2005). Podobné výsledky byly získány i z Jordánska, kde byl výskyt viru potvrzen u 3,4 % jaderovin z 1565 testovaných (1393 jabloně, 149 hrušní, 23 kdouloní) (Salem *et al.*, 2005). Monitoring provedený v Číně byl zaměřen pouze na jabloně a infekce ACLSV byla prokázána na 228 stromech (Duan *et al.*, 2013).

Také u peckovin byl proveden monitoring výskytu ACLSV. Například v Indii byl virus detekován na 14 z 53 testovaných kulturních i planých meruněk (Rana *et al.*, 2007). V Turecku byl výskyt viru sledován u širšího spektra peckovin. Celkem bylo otestováno 369 rostlin a u 51 z nich byla infekce potvrzena. Mezi sledované hostitelské rostliny patřily nektarinky (23), meruňky (15), broskvoně (63), višně (18), slivoně (52) a třešně (198). Infekce ACLSV byla prokázána u 34 % nektarinek, 26 % meruněk, 25 % broskvoní, 16 % višní, 13 % slivoní a u 6 % třešní (Ulubas a Ertunc, 2005).

Rozsáhlý monitoring výskytu ACLSV byl proveden na široké škále hostitelských rostlin v Řecku. Celkem bylo otestováno 723 rostlin. Virus byl detekován z ovocných dřevin na jabloních, mandloních, hruškách, broskvoních, slivoních, kdouloních a třešních. Nebyl potvrzen žádný pozitivní vzorek višně a meruňky. Na okrasných stromech a keřích byl virus detekován na *Prunus cerasifera*, *Cydonia japonica*, *Rosa canina*, *Crateagus monogyna*. U planě rostoucích rostlin se virus podařilo zachytit na *Rubus* sp., *Cerasus nigra*, *Prunus spinosa*, *Prunus pindicola*, *Prunus amygdaliformis*, *Rosa acicularis*, *Pyrus pyraister* (Katsiani *et al.*, 2014).

Ekonomický význam viru je složité zhodnotit. U většiny kulturně pěstovaných jaderovin je infekce bezpříznaková a pravděpodobně nedochází k významným ztrátám na výnosech. U peckovin dochází ke ztrátám na výnosech, pokud jsou virovou infekcí poškozeny přímo plody (Delbos a Dunez, 1988). Významné jsou ztráty ve školkách v případě, že dojde k inkompatibilitě roubu a podnože nebo k zasychání pupenů, což se většinou stává u meruněk (Desvignes, 1999).

3.2. Metody detekce virů jabloní

Rutinní testování rostlinného materiálu na přítomnost detailně prostudovaných virů lze provádět několika metodami. V dnešní době jsou již tyto techniky optimalizovány a provádějí se dle prověřených protokolů.

Jednou z nejdéle využívaných metod je mechanická inokulace příslušné indikátorové rostliny puřem s rostlinnou šťávou z testovaného vzorku za pomoci karborunda. Tímto testem může být odhalena přítomnost i několika virů najednou. Obdobnou metodou je roubování testovaného vzorku na indikátorovou rostlinu u virů, které se přenáší vegetativním množemím. Ve většině případů se jedná o viry ovocných dřevin (Waller *et al.*, 2002).

Další možností pro detekci virů je využití elektronové mikroskopie. Tato metoda je však časově i pracovně velmi náročná, což mělo za následek, že je nyní využívána spíše pro vědecké účely při identifikaci nových a neprozkoumaných virů.

V dnešní době jsou zmíněné diagnostické techniky často nahrazovány sérologickými a molekulárně-genetickými metodami, které jsou rychlé a relativně cenově dostupné. V případě sérologie došlo postupně k nahrazení imunodifusních a precipitačních testů komerčně dostupnými testy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Waller *et al.*, 2002). U molekulárně-genetických metod existují různé varianty RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction) testů a hybridizačních technik. V současnosti se také rozvíjí využití real-time RT-PCR pro detekci a kvantifikaci virů.

3.2.1. Detekce vybraných virů pomocí indikátorových rostlin

V případě podezření na výskyt ApMV na jabloních je možné provést mechanickou inokulaci viru na děložní lístky okurky (*Cucumis sativus*), které jsou pěstovány ve skleníku. Testy se vyhodnocují po 20 dnech od inokulace, kdy se na listech mají objevit příznaky, v podobě rozsáhlých chlorotických skvrn, žloutnutí podél žilek a zakrslosti listů. Další možností je využití roubování testovaného vzorku na dřevinné indikátory, jako je kultivar jabloně cv. Golden Delicious nebo cv. Lord Lambourne. Při roubování se přítomnost/absence patogena na rostlinách vyhodnocuje po dvou letech od založení pokusu na základě přítomnosti krémových skvrn (Mink, 1987). Pro hrušně podobná doporučení nejsou vypracována. V případě peckovin lze využít roubování na broskvoňovou podnož GF305

anebo na kultivar Elberta (Desvignes, 1976; Anonym 4, 2000). Testy je možné provádět ve skleníku, kde se rostliny vyhodnocují po třech měsících, anebo ve venkovních podmínkách, kde k vyhodnocení dochází až po dvou letech. V obou případech se na listech indikátorových rostlin vytvářejí žlutavé anebo světle zelené skvrny, které mohou tvořit kroužkovitost nebo proužkovitost (Desvignes, 1976; Neméth, 1986). U peckovin je možné využít i mechanické inokulace na bylinné indikátorové rostliny, ale tyto testy mají relativně nízkou citlivost a většinou je nutné je doplnit dalšími laboratorními testy. Mezi využívané bylinné hostitele patří *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *C. sativus*, *Petunia hybrida*, *C. pepo*, u nichž se rozvíjí různé druhy příznaků.

U ASGV je také možné využít mechanickou inokulaci na bylinné anebo roubování na dřevinné hostitele. Za nejlepší dřevinný indikátor pro ASGV je považována *Malus pumila* cv. Virginia crab, u něhož se vyvinou výrazné příznaky (nekrózy, žlábkovitost kmene, zkrácení výhonů) (De Sequeira a Posnette, 1969). Dalšími použitelnými indikátory jsou *M. sieboldii* M065 (nekrózy) a *M. micromalus* GMAL273 (Mink *et al.*, 1971; Howell *et al.*, 1996). Tyto testy se většinou provádějí ve venkovních podmínkách, ale pokud jsou pokusy přeneseny do skleníku, je možné pozorovat příznaky u *M. pumila* do 10 až 24 týdnů a u *M. micromalus* do 2 až 4 týdnů od založení pokusu (Howell *et al.*, 1996). Jako bylinné indikátory při indexování ve sklenících lze použít *Ch. quinoa* (epinastie a zakrnění listů, nekrózy) a *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto, na němž se vyvíjí typické příznaky (fialovo-hnědé skvrny nebo kroužky; chlorotické skvrny) (Massart *et al.*, 2011).

V případě ASPV je roubování na dřevinné hostitele stále standardním diagnostickým testem (Anonym 3, 1999). Ve venkovních podmínkách se jedná o časově náročný proces trvající dva až čtyři roky, než se vyvinou příznaky na listech, případně plodech. Jako indikátorové dřeviny se využívají *M. pumila* cv. Virginia Crab a Spy 227, *Pyrus communis* cv. Jules d'Airolles, Beurre Bosc a Doyenne du Comice a *Pyronia veitchii* (Stouffer a Fridlund, 1989). V případě roubování a následném indexování ve sklenících se využívá *M. pumila* cv. Virginia crab, Radiant, Kola, Sparckler a Soy 227 a *P. communis* cv. Nouveau Poiteau, Beurré bosc a Passe Crassane. Doba potřebná pro vznik příznaků se v tomto případě zkracuje na 4 až 10 týdnů (Fridlund, 1980; Gilles a Bormans, 1989). Izoláty ASPV mohou být také detekovány pomocí mechanické inokulace na bylinné indikátory *Nicotiana occidentalis* subsp. *obliqua* a *N. occidentalis* cv. 37B (Van der Meer, 1986).

V případě ACLSV u jádrovin může být použita celá řada dřevinných indikátorových rostlin pro roubování. Mezi nejčastěji používané patří *Malus sylvestris* cv. R12740-7A (tzv. Ruská jabloň), na níž se objevují chlorotické skvrny na listech a deformují se výhony, a *M. platycarpa*, na které se infekce projevuje nepravidelnou kroužkovitostí a proužkovitostí listů. Obě jabloně je možné použít při pokusech ve sklenicích i ve venkovních podmínkách (Jelkmann, 2004). Dalšími dřevinnými indikátory jsou *M. micromalus* cv. GMAL 273, *Cydonia oblonga* cv. C 7/1 nebo Pigwa, *Pyronia veitchii* a *Pyrus comunnis* cv. Nouveau Poiteau a Fieud 37. U peckovin se dřevinné indikátory pěstují ve sklenicích. Využívá se hybrid *Prunus tomentosa* IR473 x IR474, který je vyhodnocován po 12 týdnech ve 22 °C, anebo *Prunus persiaca* GF305, rostoucí 8 týdnů při 20-25 °C (Jelkmann, 2001; Jelkmann, 2004).

V případě mechanické inokulace viru se jako bylinná indikátorová rostlina využívá *Chenopodium quinoa*, na níž se objevují při infekci chlorotické a nekrotizující skvrny, a *Ch. amaranticolor*, kde se infekce projevuje chlorotickými skvrnami (Lister a Hadidi, 1971). Jako další možná indikátorová rostlina se uvádí *Nicotiana occidentalis*, ale infekce ACLSV zde může být bezpříznaková. Obvykle se však na listech objevují chlorotické skvrny, případně kroužkovitost. Problémem tohoto způsobu biologického indexování je omezená citlivost metody a tím snížená spolehlivost.

3.2.2. Sérologické testy

Původně byl ApMV pomocí sérologie detekován difusním testem v gelu (De Sequeira, 1967), ale v současnosti jsou využívány komerčně dostupné testy ELISA s různými typy protilátek (Clark a Adams, 1977; Barbara *et al.*, 1978; Torrance a Dolby, 1984). Jejich spolehlivost se však v průběhu roku mění a období, kdy je testy možné používat, není příliš dlouhé. Spolehlivost je rovněž závislá na použitém rostlinném materiálu (Torrance a Dolby, 1984).

V případě ASGV byla optimalizaci ELISA testů věnována velká pozornost, protože virus je pravděpodobně v rostlině přítomný v malém množství a je problematické ho detekovat. Dle Fuchs *et al.* (1988) je možné pro detekci použít listy pouze v jarním období, později jsou výsledky nespolehlivé. Někteří autoři doporučují testy provádět s lýkem nových výhonů, s květy anebo s dormantními pupeny (Fuchs *et al.*, 1988; Kundu *et al.*, 2003). U *in vitro* namnožených jabloňových výhonů lze ASGV detekovat také pomocí imunologického

tkáňového otisku (*immuno-tissue print*), pokud infekci ASGV nelze zachytit testy ELISA (Knapp *et al.*, 1995).

Pro ASPV byly relativně nedávno vytvořeny monoklonální protilátky, které je možné používat pro *double-antibody-sandwich* ELISA (DAS-ELISA) při rutinní diagnostice ASPV u jádrovin (Gugerli a Ramel, 2004). Do té doby byly využívány pouze polyklonální protilátky pro experimentální účely při použití technik jako je imunoelektronová mikroskopie (*immunosorbent electron microscopy*; IEM) nebo *Western blot* analýza (Jelkmann *et al.*, 1992; Paunovic *et al.*, 1999).

Detekce ACLSV je možná řadou sérologických testů jako je ELISA, imunologický tkáňový otisk (*immuno tissue printing*) anebo IEM (Flegg a Clark, 1979; Knapp *et al.*, 1995; Kerlan *et al.*, 1981). Pro rutinní detekci ACLSV jsou využívány různé varianty ELISA testů s využitím polyklonálních i monoklonálních protilátek (Poul a Dunez, 1989; 1990; Malinowski *et al.*, 1997). Spolehlivost zmíněných testů se však liší u různých hostitelských rostlin a zároveň i v průběhu vegetace v různých rostlinných orgánech (Detienne *et al.*, 1980; Knapp *et al.*, 1995). U jádrovin je dobré testy provádět s mladými listy v brzkém jarním období anebo s květy (Flegg a Clark, 1979). V mírném klimatu je k testům u peckovin doporučováno období od května do června, ale v případě třešní a slivoní jsou testy efektivnější v červnu a červenci (Karešová a Paprstein, 2001; Ciešlínska *et al.*, 1995). Řadou autorů je při sérologických testech ELISA u peckovin doporučován odběr květů na jaře, případně plodů a lýka z mladých výhonů během léta (Barba a Clark, 1986; Ciešlínska *et al.*, 1995; Llácer *et al.*, 1985).

3.2.3. Molekulárně-genetické techniky

Pro všechny studované viry bylo vyvinuto mnoho různých variant standardní RT-PCR reakce a zároveň bylo vyvinuto i několik variant multiplex RT-PCR, kde je možné studované viry detekovat současně (Alrefai *et al.*, 1994; Hassan *et al.*, 2006; James, 1998; Jelkmann a Keim-Konrad, 1997; Kinard *et al.*, 1996, 1999; Kirby *et al.*, 2001; Kundu, 2003b; Malinowski *et al.*, 1998; Menzel *et al.*, 2002; Nemchinov *et al.*, 1995; Paunovic a Jevremovic, 2004; Rowhani *et al.*, 1995; Saade *et al.*, 2000; Sanchez-Navarro a Pallas, 1994). Časté je i spojení molekulárních metod se sérologickými v IC-RT-PCR (*immunocapture – reverse transcription – polymerase chain reaction*) (Candresse *et al.*, 1998, 1995; Crosley *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 2001; Nemchinov *et al.*, 1995). Hybridizačních technik byla navržena také

celá řada s variantami pro detekci jednotlivých virů i pro multiplex (Matic *et al.*, 2008; Herranz *et al.*, 2005). V případě ApMV a ACLSV na peckovinách byla vyvinuta také multiplex mikrohybridizační metoda, ale diagnostický čip není zatím komerčně k dispozici (Lenz a Petrzik, 2005). Pro ACLSV a ASPV byly navrženy fluorogenické 3'-minor groove binder-DNA sondy, které lze použít pro real-time 5' nuclease RT-PCR detekci (Roussel *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2002).

3.3. Možnosti ochrany proti virům jableň

Jelikož je hlavním způsobem přenosu všech zmiňovaných virů jádrovin vegetativní množení, je účinnou metodou ochrany prevence, tedy používání certifikovaného rostlinného materiálu, čímž se účinně zabrání přenosu viru. Certifikační schémata sadby jsou doporučována různými organizacemi zabývajícími se ochranou rostlin např. IR-2/NRSP-5 (známý jako NCPN-FT: National Clean Plant Network for Fruit Trees) ve Spojených Státech Amerických anebo EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) v rámci evropských zemí.

V případě, že jsou rostliny virem již infikovány, je možné využití termoterapie, chemoterapie nebo namnožení rostlin z meristémových kultur. Existují publikované protokoly pro jednotlivé viry, jak v těchto případech postupovat (ApMV: Barba *et al.*, 1992; Bhardwaj *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 1988; ASGV: James *et al.*, 1997; De Sequeira a Posnette, 1969; Wang *et al.*, 2006; ASPV: Mink *et al.*, 1998; Neméth, 1986; ACLSV: Campbell, 1968; Ciešlińska, 2002; Deogratias *et al.*, 1989; Welsh a Nyland, 1965; Hansen a Lane, 1985).

4. Metodika

4.1. Optimalizace diagnostických metod

4.1.1. Rostlinný materiál

Pro optimalizaci doby odběru vzorků pro jednotlivé detekční metody studovaných virů bylo zvoleno pět stromů jabloní s dříve ověřenou směsnou infekcí ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR. Jednalo se o odrůdy Rubín, Bohemia, Topaz, Angold a Idared ze soukromé zahrady v okolí Suchdola. Stromy byly vysazeny v 70. letech a přeroubovány v 80. letech.

Z každého stromu bylo odebíráno pět vzorků z různých částí stromu, aby byla ověřena rovnoměrná distribuce virů na stromech. Vzorky byly odebírány čtyřikrát v průběhu roku 2014, pokaždé v jiném ročním období (březnu/dubnu, červnu, září a prosinci). Vždy byly odebrány vzorky každého rostlinného materiálu (lýko, pupeny, listy a květy), který byl v daném období na stromě přítomen.

4.1.2. Sérologická metoda DAS/I ELISA

Pro sérologické testy byly použity specifické protilátky od firmy Agritest, Loewe a Bioreba. Reakce byly prováděny v 96 jamkových průhledných mikrotitračních destičkách (ImmunoTM, Nunc). Podrobné protokoly jsou popsány v následujícím textu.

- 1) Jamky destiček byly potaženy 100 μ l potahovacího pufru s polyklonální protilátkou příslušného viru (zásobní roztok IgG byl ředěn potahovacím pufrem dle návodu výrobce) a poté byly 2 hod inkubovány ve 37 °C. Po inkubaci byly destičky čtyřikrát promyty promývacím pufrem s využitím HydroFlexTM microplate washer – Software (Tecan) a přístroje HydrocontrolTM Tecan.
- 2) Z čerstvého, případně v chladničce při 4 °C uchovávaného, rostlinného materiálu, odebraného přibližně z pěti listů (případně pupenů, květů anebo větviček) testované rostliny byl připraven vzorek o hmotnosti 100 mg. V případě větviček je nutné skalpelem odstranit vrchní borku a odebírat pouze zelené lýko. Mezi jednotlivými vzorky je třeba skalpel desinfikovat. Ve třetí misce bylo následně rozdrobeno 100 mg připraveného rostlinného materiálu v 2 000 μ l extrakčního pufru (doporučené ředění výrobcem kitu bylo 1:20).

- (a) Detekce ApMV s využitím monoklonálních protilátek od firmy Agritest:
100 µl vzorku bylo napipetováno v dupletech do jamek včetně negativní a pozitivní kontroly dodané výrobcem protilátek. Do první dvojice jamek bylo napipetováno pouze 100 µl extrakčního pufru. Destička byla nechána přes noc ve 4 °C. Druhý den byla destička čtyřikrát promyta a potažena 100 µl extrakčního pufru s monoklonálními protilátkami (zásobní roztok IgG byl ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a byla ponechána 2 hod ve 37 °C. Pak byla destička znovu čtyřikrát promyta. Do destičky bylo napipetováno 100 µl extrakčního pufru s protilátkami značenými alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP byl ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a následovala inkubace 2 hod ve 37 °C. Poté byla destička čtyřikrát promyta.
- (b) Detekce ASPV a ASGV s využitím polyklonálních protilátek od firmy Bioreba: 100 µl vzorku bylo napipetováno v dupletech do jamek včetně negativní a pozitivní kontroly dodané výrobcem protilátek. Do první dvojice jamek bylo napipetováno pouze 100 µl extrakčního pufru. Destičky byly nechány přes noc ve 4 °C. Druhý den byly destičky čtyřikrát promyty. Poté byly destičky potaženy 100 µl extrakčního pufru s protilátkami značenými alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP byl ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce) a nechaly se 4 hod inkubovat ve 37 °C. Pak byly destičky znovu čtyřikrát promyty.
- (c) Detekce ACLSV s využitím polyklonálních protilátek od firmy Loewe: 50 µl vzorku bylo napipetováno v dupletech do jamek spolu s 50 µl extrakčního pufru s protilátkou značenou alkalickou fosfatázou (zásobní roztok IgG-AP byl ředěn extrakčním pufrem dle návodu výrobce). Stejný postup byl i v případě pouze extrakčního pufru a pozitivní a negativní kontroly. Destička byla nechána ve 4 °C. Druhý den byla destička čtyřikrát promyta.
- 3) Do mikrotitračních destiček bylo přidáno 100 µl substrátového pufru se substrátem (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate; 1 mg/ml). Po třech hodinách

byl výsledek vyhodnocen pomocí Magellan™ Data analysis software (Tecan) na Tecan Sunrise™ přístroji.

Použité chemikálie:

- Potahovací pufr (pH 9,6) – 1,59 g Na₂CO₃ a 2,93 g NaHCO₃ rozpustit v destilované vodě a doplnit do 1 l. Uchovávat při 4 °C.
- Promývací pufr (pH 7,2 – 7,4) – 8 g NaCl, 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl a 0,5 ml Tween 20 rozpustit v destilované vodě a doplnit do 1 l. Uchovávat při 4 °C.
- Extrakční pufr (pH 7,4) – 20 g polyvinyl pyrrolidinu, 2 g bovine serum albuminu rozpustit v 1 l promývacího pufru. Uchovávat při 4 °C maximálně 1 týden.
- Substrátový pufr (pH 9,8) – 97 ml diethanolaminu, 0,2 g MgCl₂ x 6 H₂O rozpustit v destilované vodě a doplnit do 1 l. Uchovávat při 4 °C.

4.1.3. Molekulární metoda RT-PCR

4.1.3.1. Izolace celkové RNA „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001)

100 mg čerstvého či zamrazeného biologického materiálu, odebraného přibližně z pěti listů (případně pupenů, květů anebo větviček) testované rostliny, bylo převedeno do třecí misky a za pomoci tekutého dusíku rozdrceno na drobný prášek. Po odpaření dusíku bylo přidáno 1 000 µl grinding pufru, do něhož byl před použitím přidán 2% metabisulfát sodný. Vzniklý homogenát byl převeden do mikrozkušavky. Po centrifugaci (6 000 RPM, 3 min, 4 °C) bylo do nové mikrozkušavky převedeno 500 µl supernatantu a k němu bylo přidáno 100 µl 10% N-lauronyl-sarkosinu. Vzorek byl inkubován 10 min při teplotě 70 °C a v průběhu inkubace byl promícháván každé 3 min na dotykové třepačce. Poté byl inkubován 5 min na ledu a následovala centrifugace (13 000 RPM, 10 min, 4 °C). Do nové mikrozkušavky bylo převedeno 300 µl supernatantu a ke vzorku bylo přidáno 150 µl chlazeného absolutního etanolu, 300 µl roztoku jodidu sodného a 30 µl silika suspenze. Vzorek byl umístěn na horizontální třepačku (600 RPM), kde byl inkubován 10 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci (6 000 RPM, 1 min, 4 °C) byl supernatant odlit a peleta byla promyta 500 µl promývacího pufru, tento krok se jednou opakoval. Po odstranění supernatantu byla mikrozkušavka sušena při laboratorní teplotě zhruba 10 min. Peleta byla poté

resuspendována ve 150 μ l sterilní ddH₂O a poté následovala inkubace při 70 °C po dobu 4 min. Po centrifugaci (13 000 RPM, 3 min, 4 °C) bylo převedeno 120 μ l supernatantu do nové mikrokumavky. Takto získaný vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu při -21 °C nebo byl hned použit pro další analýzy.

Použité chemikálie:

- Grinding pufr (pH 5,4 – pH upraveno kyselinou octovou) – 4 M guanidin thiokyanát; 0,2 M octan sodný; 1 M octan draselný; 25 mM EDTA; 2,5% PVP (w/V). Uchovávat při 4 °C. Před použitím přidat 2% metabisulfát sodný (w/V).
- 10% N-lauronyl-sarkosin (w/V). Uchovávat při 4 °C.
- Jodid sodný – 0,75 g Na₂SO₃ rozpustit ve 40 ml sterilní ddH₂O a přidat 36 g 6 M NaI. Uchovávat v tmavé láhvi při 4 °C.
- Ledový absolutní etanol.
- Promývací pufr (pH 7,5) – 10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; 50 mM NaCl. Pomocí autoklávu sterilizovat a poté přidat absolutní etanol (50 % objemu). Uchovávat při 4 °C.
- Silika suspenze (pH 2,0) – 30 g silika částic rozpustit ve 250 ml sterilní ddH₂O, suspenzi promíchat a ponechat do druhého dne sedimentovat. Následující den horní fázi, přibližně 235 ml, odstranit a zbylý roztok doplnit vodou do 250 ml, opět promíchat a ponechat 5 hod sedimentovat. 220 ml horní fáze odpipetovat a zbylý roztok homogenizovat. Roztok sterilizovat pomocí autoklávu a uchovávat v tmavé láhvi při 4 °C.
- Sterilní ddH₂O

4.1.3.2. Stanovení koncentrace a čistoty vyizolované celkové RNA

Množství a kvalita celkové RNA byla určena spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000 (ThermoScientific, USA) při vlnové délce 260 nm, respektive 280 nm ($A_{260} = 1$ koncentrace celkové RNA je 40 μ g/ml; kvalita RNA je poměr A_{260}/A_{280} , doporučená hodnota se pohybuje v intervalu 1,6 - 2,0).

4.1.3.3. Reverzní transkripce

Z vyzolované celkové RNA byla následně syntetizována komplementární DNA (complementary DNA, cDNA). Reakce probíhala v reakčním objemu 50 μl . Nejprve byl připraven premix o objemu 30 μl , který obsahoval:

- X μl sterilní ddH₂O
- 0,5 μl *Primer "random"* (zásobní roztok 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; finální koncentrace 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Roche)
- přibližně 750 ng celkové RNA.

Vzorek byl 5 min inkubován při 100 °C a poté 2 min na ledu. Následně bylo k premixu přidáno:

- 10 μl *5x First Strand Buffer* (finální koncentrace 1x; Invitrogen)
- 4,8 μl sterilní ddH₂O
- 2,5 μl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,5 mM; ThermoFisherScientific)
- 2,0 μl DTT (zásobní roztok 0,1 mM; finální koncentrace 4 mM; Invitrogen)
- 0,7 μl *M-MuLV Reverse Transcriptase* (zásobní roztok 200 U/ μl ; finální koncentrace 40 U/ μl ; ThermoFisherScientific).

Mikrozkušavka byla ponechána ve 42 °C po dobu 55 min a poté byla inkubována při 70 °C 10 min.

4.1.3.4. Polymerázová řetězová reakce

Takto získaná cDNA byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Reakce PCR probíhala v celkovém objemu 25 μl , který obsahoval:

- 18,05 μl sterilní ddH₂O
- 2,5 μl *10x Dream Taq buffer* (finální koncentrace 1x; ThermoFisherScientific)
- 0,25 μl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,1 mM; ThermoFisherScientific)
- 0,5 μl reverzního primeru (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM) – tab. 2
- 0,5 μl forwardového primeru (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM) – tab. 2

- 0,2 µl *DreamTaq™ DNA Polymerase* (zásobní roztok 5 U/µl; finální koncentrace 0,04 U/µl; ThermoFisherScientific)
- 3 µl cDNA vzorku.

Pro PCR byl použit termocycler MJ Research PTC 200. Podmínky během amplifikace byly následující: 94 °C 2 min; 35 cyklů: denaturace 94 °C 30 s, annealing dle použitých primerů 30 s (tab. 2), extenze 72 °C 1 min; konečná extenze 72 °C 7 min.

Tabulka 2. Optimalizované specifické primery pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR. FP – forwardový primer; RP – reverzní primer.

Virus	Autor	Název	Typ	Sekvence	Teplota annealingu	Délka fragmentu
ApMV	Petrzik, unpublished	161Z8	FP	5'-TCC TGA GCA GTC GAG AAG TG-3'	58 °C	464 bp
		161Z9	RP	5'-CGT TAT CAC GTA CAA ATC CCT-3'		
ACLSV	Watpade <i>et al.</i> , 2012	ACLSV1F	FP	5'- TCG CGA ACA TAG CGA TAC AG - 3'	57 °C	432 bp
		ACLSV1R	RP	5'- ACG ACA TTT TCG CCT CAT TC - 3'		
ASGV	James, 1999	ASGVUs	FP	5' - CCC GCT GTT GGA TTT GAT ACA CCTC - 3'	66 °C	499 bp
		ASGV2as	RP	5' - GGA ATT TCA CAC GAC TCC TAA CCC TCC - 3'		
ASPV	Jelkmann a Keim-Konrad, 1997	ASPCs	FP	5' - CTC TTG AAC CAG CTG ATG GC - 3'	60 °C	264 bp
		ASPas	RP	5' - ATA GCC GCC CCG GTT AGG TT - 3'		

4.1.3.5. Elektroforetická separace a vizualizace nukleových kyselin

Pro separaci PCR produktů byla využita souprava pro horizontální elektroforézu (HE 33 Mini Submarine Unit, Basic, Amersham Biosciences nebo MultiSUB Midi, Cleaver Scientific Ltd). Nejdříve byla v mikrovlnné troubě rozvařena 1% agaróza v 1x TBE pufru. Po jejím ochlazení na teplotu přibližně 60 °C byl do agarózy přidán roztok ethidium bromidu (finální koncentrace 0,5 µl/ml). Poté byl gel přelit do elektroforetické formy, do níž byl vložen hřeben pro vytvarování jamek. Gel byl ponechán přibližně 30 min při laboratorní teplotě, následně byl vyjmut hřeben a forma s gelem byla umístěna do elektroforetické cely a

převrstvena 1x TBE puforem. 10 µl PCR produktu vzorku, negativní a pozitivní kontroly bylo smícháno s 2 µl nanášecího barviva (*6x DNA Loading Dye*, ThermoFisherScientific) a převedeno do jamek v gelu. Do první a poslední jamky bylo nanášeno 2 µl standardu molekulové hmotnosti (*O'GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder*; ThermoFisherScientific). Poté byla spuštěna elektroforetická separace nukleových kyselin při intenzitě elektrického napětí zhruba 5 V/cm. Separace trvala přibližně 45 minut. Po ukončení elektroforetické separace byly fragmenty vizualizovány na UV-transiluminátoru při vlnové délce 260 nm. Výsledné elektroforeogramy byly zdokumentovány automatickým dokumentačním a analytickým Bio-Imaging systémem InGenius (Syngene).

Použité chemikálie:

- agaróza (SeaKem[®] LE Agarose; Lonza)
- ethidium bromid (1 mg/ml)
- TBE (Tris-borát-EDTA) – 108 g Tris 108, 55 g kyselina boritá, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) doplnit destilovanou vodou do 1000 ml (zásobní roztok = 10x).

4.1.4. Molekulární metoda qRT-PCR

4.1.4.1. Izolace, stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA

Izolace celkové RNA byla provedena dle protokolu uvedeného v kapitole 4.1.3.1. Její koncentrace a čistota byla stanovena na základě postupu uvedeného v kapitole 4.1.3.2.

4.1.4.2. Návrh primerů pro qRT-PCR

Pro qRT-PCR bylo třeba navrhnout specifické primery pro detekci sledovaných virů. Pro návržení primerů byly použity virové sekvence dostupné v databázi NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), v případě ApMV se jednalo o kompletní nukleotidové sekvence obalového proteinu, u ostatních virů (ACLSV, ASPV, ASGV) byly použity dostupné kompletní sekvence jejich celého genomu.

Primery byly navrženy ručně pomocí programu Bioedit 7.2.5. (Ibis Biosciences, USA), protože sekvence vykazovaly značnou variabilitu a využití programu Primer3 (Rozen a Skaletsky, 2000) a BLAST (Altschul *et al.*, 1997) se neprokázalo jako dostatečně efektivní způsob jejich desingu. Ověření vlastností primerů (délka 18-24 bp; T_m přibližně 60 °C; G/C okolo 50 %; GC clamp < 3; runs < 4) bylo prováděno pomocí programu OligoEvaluatorTM

(Sigma-Aldrich Co.). *In silico* byla specifita primerů ověřena pomocí programu BLAST (Altschul *et al.*, 1997) a databáze NCBI.

In vivo byla ověřena specifita primerů na několika vzorcích cDNA zdravých a infikovaných jabloní pomocí PCR (obr. 1). Reakce byla provedena dle protokolu uvedeného v kapitole 4.1.3.4, s využitím nově navržených primerů pro jednotlivé viry (tab. 3).

Vizualizace nukleových kyselin byla provedena pomocí vertikální polyakrylamidové elektroforézy (Maxigel G48, Whatman, Biometra). Nejdříve byl připraven 3,5% polyakrylamidový gel o následujícím složení:

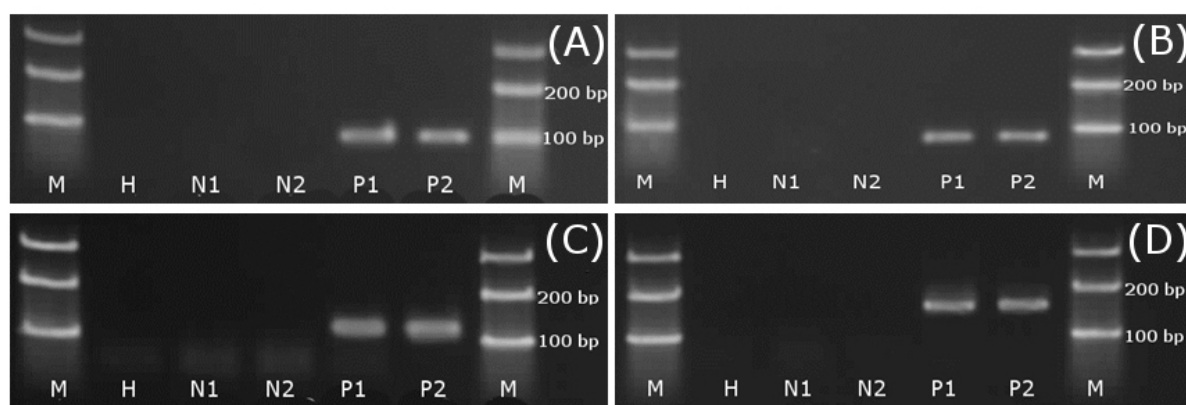
- 7,7 ml sterilní ddH₂O
- 1 ml 10x TBE pufru (složení v kapitole 4.1.3.5.)
- 1,3 ml 40% polyakrylamidu (Biorad)
- 100 µl 1% APS (Fluka, Biochemica)
- 10 µl TEMED (Sigma-Aldrich Co.).

Gel byl nalit mezi předpřipravená elektroforetická skla a byl do něj zasunut hřeben na vytvarování jamek. Po ztuhnutí gelu (zhruba 20 min) byla skla umístěna do elektroforetické cely a přelita 1x TBE puforem. Po vyjmutí hřebenu bylo do první a poslední jamky napipetováno 5 µl standardu molekulové hmotnosti (*O'RangeRulerTM 20 bp DNA Ladder*; ThermoFisherScientific) a do ostatních jamek 10 µl od každého vzorku s nanášecím barvivem *6x DNA Loading Dye* (ThermoFisherScientific). Poté byla spuštěna elektroforetická separace nukleových kyselin při intenzitě elektrického napětí zhruba 5 V/cm. Separace trvala přibližně 45 minut. Po ukončení elektroforetické separace byly fragmenty vizualizovány barvením stříbrem. Nejdříve byl polyakrylamidový gel umístěn na 20 min do 100 ml 10% kyseliny octové. Poté byl třikrát promyt sterilní ddH₂O a vložen na 3 min do 100 ml 1% kyseliny dusičné. Po opětovném promytí byl gel 17 min inkubován v roztoku stříbra (100 mg AgNO₃, 150 µl formaldehydu, 100 ml ddH₂O). Po dalším promytí byl gel vložen do roztoku uhličitanu sodného (3 g NaCO₃, 150 µl formaldehydu, 6 µl 20% thiosulfanu sodného a 100 ml ddH₂O), kde došlo ke zbarvení DNA fragmentů. Poté byla barevná reakce ukončena 3% kyselinou octovou. Výsledné elektroforeogramy byly zdokumentovány pomocí skeneru.

Tabulka 3. Optimalizované specifické primery pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV pomocí metody qRT-PCR. FP – forwardový primer; RP – reverzní primer.

Virus	Název	Typ	Sekvence	Teplota annealingu	Délka fragmentu
ApMV	ApMVXF1	FP	5'-CAAGCGAACCCGAATAAGG-3'	67 °C	87 bp
	ApMVXR1	RP	5'-CTAACCTCCCAAGCTGTCC-3'		
ACLSV	ACLSVF2	FP	5'-GAGGCTCTATTACATCTTG-3'	65 °C	148 bp
	ACLSVR2	RP	5'-CATCATCGCCATCTTCGTC-3'		
ASGV	ASGVF1	FP	5'-GGATTTAGGTCCCTCTCAGC-3'	65 °C	70 bp
	ASGVR1	RP	5'-CTTGTTGAAGCACGTCTTCC-3'		
ASPV	ASPVF3	FP	5'-GAACTGCYGCAGAGGAAG-3'	60 °C	104 bp
	ASPVR3	RP	5'-CATGYTTGTCCTTCTCYAC-3'		

Obrázek 1. Test specifity primerů navržených pro účely kvantitativní RT-PCR pro detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. (A): ApMVXF1/ApMVXR1 (87 bp); (B): ASGVF1/ASGVR1 (70 bp); (C): ASPVF3/ASPVR3 (104 bp) a (D): ACLSVF2/ACLSVR2 (148 bp). (M): DNA marker (O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder); (H): negativní kontrola ddH₂O; (N1): negativní kontrola získaná z viruprosté jabloně; (N2): negativní kontrola získaná z viruprosté hrušně; (P1) a (P2): RT-PCR produkty získané z ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV infikovaných jabloní. Agarózový gel barvený etidium bromidem, vytvořený pro lepší grafickou podobu se vzorky již dříve testovanými na polyakrylamidovém gelu.



4.1.4.3. qRT – PCR

Detekce virů probíhala pomocí *Power SYBR[®] Green RNA-to-C_TTM 1-Step Kit* (Applied BiosystemsTM). Reakce v konečném objemu 10 µl měla toto složení:

- 3,32 μl sterilní ddH₂O
- 5 μl 2x *Power SYBR[®] Green RT-PCR Mix*
- 0,3 μl forwardového primeru (zásobní roztok 10 μM , finální koncentrace 0,3 μM) – tab. 3.
- 0,3 μl reverzního primeru (zásobní roztok 10 μM , finální koncentrace 0,3 μM) – tab. 3.
- 0,08 μl *125x RT Enzym Mix*
- 1 μl RNA (100 ng/ μl).

Vzorky, negativní i pozitivní kontroly byly pipetovány v dupletech. Real-time RT-PCR reakce probíhala v termocykléru CFX96 Touch[™] (Biorad) za těchto podmínek: reverzní transkripce 48 °C 30 min; aktivace polymerázy 95 °C 10 min; 40 cyklů: denaturace 95 °C 15 s, annealing a extenze 60 °C 1 min. Po každém cyklu bylo změřeno množství uvolněného barviva. Na konci byla stanovena křivka tání v opakujícím se cyklu při těchto podmínkách: denaturace 95 °C 15 s; annealing postupně od 60 – 95 °C.

4.2. Kvantifikace vybraných virů

4.2.1. Rostlinný materiál

Tři vybrané odrůdy jabloní, jmenovitě odrůdy Bohemia, Topaz a Rubín se směsnou infekcí všemi čtyřmi viry byly použity pro podrobnější analýzy zaměřené na kvantifikaci virů v rostlinném pletivu. V průběhu vegetace v roce 2015 byly z rostlin odebírány pupeny, listy, květy a lýko. Listy byly v průběhu vegetace odebírány každý měsíc, lýko v březnu, červnu, říjnu a prosinci. Ostatní rostlinné orgány v době, kdy se na stromě vyskytují.

4.2.2. Relativní kvantifikace jabloňových virů pomocí sérologických technik

V případě relativní kvantifikace virů pomocí metody DAS/DASI – ELISA byl postup stejný jako v kap. 4.1.2., testované vzorky byly však připraveny jiným způsobem. Navážka rostlinného materiálu byla 200 mg. Vzorek byl rozdrcen ve třecí misce spolu s 4000 μ l extrakčního pufru, čímž vzniklo počáteční ředění 1:20. Další ředění byla připravena podle následujícího schématu:

Ředění	Množství předcházejícího ředění (μl)	Množství extrakčního pufru (μl)
50x	1 200	1 600
100x	1 600	1 600
500x	800	3 200
1 000x	1 600	1 600
5 000x	800	3 200
10 000x	1 600	1 600
50 000x	800	3 200
100 000x	1 600	1 600
500 000x	800	3 200

4.2.3. Relativní kvantifikace jabloňových virů pomocí RT-PCR

Relativní kvantifikace metodou RT – PCR byla prováděna podle protokolů uvedených v kap. 4.1.3., ale s rozdílnou přípravou vzorků v prvním kroku izolace celkové RNA.

Navážka rostlinného materiálu byla 200 mg. Ta byla převedena do třecí misky, kde byla s pomocí tekutého dusíku rozdrčena. Po jeho odpaření bylo přidáno 2 000 μ l grinding pufru, čímž vzniklo ředění 1:10. Z této koncentrace byla následná ředění připravena podle následujícího schématu:

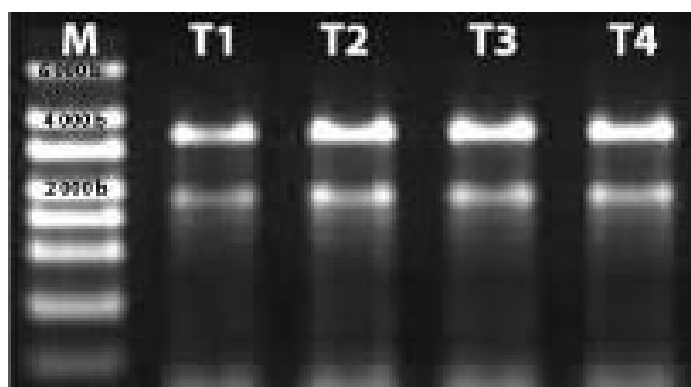
Ředění	Množství předcházejícího ředění (μl)	Množství grinding pufru (μl)
50x	400	1 600
100x	800	800
500x	400	1 600
1 000x	800	800
5 000x	400	1 600
10 000x	800	800
50 000x	400	1 600
100 000x	800	800

Do dalšího kroku izolace bylo použito pouze 1 000 μ l vzorku připraveného dle schématu.

Při relativní kvantifikaci virů byla u vyizolované celkové RNA před samotnou RT-PCR reakcí ověřována také její kvalita stanovením integrity celkové RNA s využitím semi-denaturační elektroforetické separace RNA na horizontální agarózové elektroforéze (MultiSUB Midi, Cleaver Scientific Ltd.). 1% agarózový gel byl připraven rozpuštěním agarózy v 1x TBE pufru (složení pufru v kap. 4.1.3.5.) v mikrovlnné troubě. Po ztuhnutí gelu byl vzorek celkové RNA o koncentraci 100 ng/ μ l smíchán s nanášecím barvivem 2x *RNA Loading Dye* (ThermoFisherScientific) a před nanesením do gelu byl 10 min inkubován při teplotě 70 °C a poté rychle zchlazen na ledu. Separace celkové RNA probíhala 1 hodinu při stejnosměrném napětí 4 – 6 V/cm. Po ukončení separace byla nukleová kyselina

vizualizována na UV-transiluminátoru při vlnové délce 260 nm (obr. 2). K vizualizaci RNA molekul byl použit etidium bromid (konečná koncentrace 0,5 µg/ml). Fragменты byly porovnány s hmotnostním standardem *RiboRulerTM High Range RNA Ladder* (ThermoFisherScientific). Výsledný elektroforeogram byl zdokumentován automatickým dokumentačním a analytickým Bio-Imaging systémem InGenius (Syngene).

Obrázek 2. Test integrity izolované celkové RNA. Na obrázku elektroforeogram polymerů RNA po separaci na semidenaturačním agarózovém gelu. M: *RiboRulerTM High Range RNA Ladder* (ThermoFisherScientific); T1-T4: vzorky celkové RNA po izolaci silika metodou dle Rott a Jelkmann (2001). Na gelu jsou patrné pro každou RNA dva intaktní bandy, z nichž větší reprezentuje RNA velké ribozomální podjednotky a menší RNA malé ribozomální podjednotky. Integrita RNA je u všech testovaných vzorků (T1-T4) velmi dobrá. Foto: L. Grimová.



4.2.4. Absolutní kvantifikace jabloňových virů pomocí qRT-PCR

4.2.4.1. Izolace celkové RNA pomocí *SpectrumTM Plant Total RNA kit*

Celková RNA byla izolována pomocí komerčního kitu *SpectrumTM Plant Total RNA kit* (Sigma-Aldrich Co.). Uvedený postup byl doporučen výrobcem, složení roztoků není uvedeno.

Navážka rostlinného materiálu činila 50 mg. Biologický vzorek byl rozdrcen ve třecí misce pomocí tekutého dusíku. Po jeho odpaření bylo k rostlinnému materiálu přidáno 500 µl *Lysis Solution*, do kterého bylo přidáno 5 µl 2-mercaptoethanolu, a vzorek byl promíchán na vortexu (1 800 RPM) nejméně po dobu 30 s. Poté následovala inkubace 4 min v 56 °C a centrifugace (3 min, 14 000 g, 4 °C). Supernatant byl převeden do *Filtration column* (součást komerčního kitu), která byla umístěna do 2 ml mikrozkuhavky. Následovala opět centrifugace (1 min, 14 000 g, 4 °C), po níž byla kolonka odstraněna a zbylý supernatant byl

smíchán se 750 μl *Binding Solution*. Vzorek byl promíchán na vortexu (600 RPM, 30 s) a 500 μl směsi bylo přepipetováno na *Binding column*, která byla umístěna do 2 ml mikrokumavky. Po následné centrifugaci (1 min, 14 000 g, 4 °C) byl odstraněn supernatant a do kolonky byl přidán zbytek směsi, opět následovala centrifugace (1 min, 14 000 g, 4 °C). Supernatant byl opět odstraněn a do kolonky bylo přidáno 500 μl *Wash Solution 1*. Po centrifugaci (1 min, 14 000 g, 4 °C) byl supernatant odstraněn a bylo přidáno 500 μl *Wash Solution 2*. Po centrifugaci (1 min, 14 000 g, 4 °C) byl opět odstraněn supernatant a do mikrokumavky bylo znovu připipetováno 500 μl *Wash Solution 2*. Po další centrifugaci (1 min, 14 000 g, 4 °C) byl opět odstraněn supernatant a centrifugace se zopakovala tzv. „na sucho“. Následně byla kolonka přemístěna do 2 ml mikrokumavky a na střed filtru kolonky bylo napipetováno 50 μl *Elution Solution*. Vzorek byl ponechán jednu minutu při pokojové teplotě a poté následovala centrifugace (1 min, 14 000 g, 4 °C). Takto vyizolovaná celková RNA byla použita pro další analýzy anebo byla uskladněna v mrazicím boxu při -21 °C.

4.2.4.2. Stanovení koncentrace, čistoty a kvality vyizolované celkové RNA

Koncentrace a čistota vyizolované celkové RNA byla stanovena na základě postupu uvedeného v kapitole 4.1.3.2. Kvalita získané celkové RNA byla ověřena podle protokolu popsaného v kapitole 4.2.3.

4.2.4.3. Příprava standardní křivky pro kvantifikaci virů

4.2.4.3.1. Příprava plazmidů

4.2.4.3.1.1. Příprava vzorků

PCR reakce probíhala v objemu 25 μl a měla toto složení:

- 16,05 μl sterilní ddH₂O
- 2,5 μl *10x High Fidelity Buffer* (finální koncentrace 1x; Invitrogen)
- 2 μl MgSO₄ (zásobní roztok 50 mM; finální koncentrace 4 mM; Invitrogen)
- 0,25 μl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,1 mM; ThermoFisherScientific)
- 0,5 μl reverzního primeru (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM) – tab. 3

- 0,5 μ l forwardového primeru (zásobní roztok 10 μ M; finální koncentrace 0,2 μ M) – tab. 3
- 0,2 μ l *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (zásobní roztok 5 U/ μ l; finální koncentrace 0,04 U/ μ l; Invitrogen)
- 3 μ l cDNA vzorku.

Vzorek byl umístěn do termocykleru a byl inkubován za těchto podmínek: 94°C 1 min; 30 cyklů: denaturace 94 °C 30 s, annealing dle použitého páru primerů 30 s (tab. 3), extenze 68 °C 45 s; konečná extenze 68 °C 7 min.

Následovala separace PCR produktů (*O'GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder* případně *O'RangeRulerTM 20 bp DNA Ladder*; ThermoFisherScientific) pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Podrobný protokol je uveden v kapitole 4.1.3.5.

Poté byla provedena purifikace PCR produktů pomocí *QIAquick gel extraction kit MiniElute* (Qiagen). Nejdříve byl vyříznut DNA fragment z gelu, umístěn do mikrozkušavky a zvážen. Poté byl do mikrozkušavky přidán *Buffer QG* o třech objemech hmotnosti vyříznutého gelového nosiče (100 mg odpovídalo 100 μ l). Vzniklá suspenze byla umístěna na 10 min do 50 °C a každé 3 min byla v ruce promíchána. Pak byl do mikrozkušavky přidán isopropanol ve stejném objemu jako byla hmotnost vyříznutého gelového nosiče (100 mg odpovídalo 100 μ l) a suspenze byla opět promíchána. Suspenze byla převedena do mikrozkušavky, v níž byla umístěna kolonka s membránou a následovala centrifugace (1 min, 17 900 g, 21 °C). Poté byla odstraněna vodní fáze a do kolonky byl přidán *QG Buffer*, 500 μ l. Vzorek byl opět centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C) a vodní fáze byla opět odstraněna. Pak bylo přidáno 750 μ l *PE Buffer* a mikrozkušavka byla 3 min inkubována při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek opět centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C). Vodní fáze byla odstraněna a následovala centrifugace "na sucho" (1 min, 17 900 g, 21 °C). Po opětovném odstranění vodní fáze bylo přidáno přímo na membránu 10 μ l *EB Buffer* a kolonka byla umístěna do mikrozkušavky a vzorek byl centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C). Poté byla suspenze převedena znovu na membránu a byla 3 min inkubována při laboratorní teplotě. Následovala konečná centrifugace (1 min, 17 900 g, 21 °C). Purifikovaný vzorek DNA byl ihned použit pro další analýzy, nebo byl uchováván v mrazicím boxu při -21 °C.

4.2.4.3.1.2. Ligace pomocí *StrataClone PCR Cloning Kit*

Pro ligaci PCR fragmentů do plazmidových vektorů a jejich následnou transformaci do bakteriálních buněk byl použit kit *StrataClone PCR Cloning Kit* (Agilent Technologies, USA). Uvedený postup byl doporučen samotným výrobcem.

Ligační směs obsahovala:

- 1,5 μ l *StrataClone Cloning Buffer*
- 1 μ l PCR produktu
- 0,5 μ l *StrataClone PCR Cloning Vector mix pSC-A-amp/kan*

Ligační směs byla pipetou promíchána a inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Poté byl celý její objem (3 μ l) převeden do mikrozkušavky k 25 μ l bakteriálních buněk *StrataClone SoloPack Competent Cells* (Agilent Technologies, USA). Následovala 30 min inkubace na ledu. Poté byla mikrozkušavka umístěna na 45 s do 42 °C a následně prudce zchlazena na ledu (2 min). Ke vzorku bylo přidáno 250 μ l LB Media, zahřátého na 42 °C. Vzorek byl inkubován ve 37 °C po dobu 1 hodiny za horizontálního třepání (600 RPM). Poté bylo 100 μ l vzorku přeneseno na LB agaróзовé misky s ampicilinem (konečná koncentrace 100 μ g/ml), na které bylo se zhruba 30 minutovým předstihem přidáno 40 μ l 2% X-galu. Misky s bakteriálními buňkami byly inkubovány 12 hodin ve 37 °C.

Použité chemikálie:

- Roztok LB media (pH 7) - 20 g LB media rozpustit v 1 l ddH₂O. Sterilizovat po dobu 20 min. Uchovávat při 4 °C.
- LB agaróзовé misky (pH 7) – 35 g LB agaru rozpustit v 1 l ddH₂O. Roztok sterilizovat po dobu 20 min. Poté přidat 1 ml ampicilinu (100 mg/ml). Po rozlití do misek uchovávat při 4 °C.

4.2.4.3.1.3. Kontrola bakteriálních klonů

Na miskách byly druhý den pozorovány narostlé bílé kolonie bakterií, u kterých došlo k transformaci vektoru a tím k porušení genu pro β -galaktosidázu a modré kolonie, u kterých s největší pravděpodobností PCR produkt do vektoru inkorporován nebyl, jelikož u těchto kolonií probíhala exprese genu pro β -galaktosidázu, která následně štěpila substrát X-gal (obr. 3). Kompetentní buňky, které vůbec neobsahovaly plazmidový vektor, na agaru nenarostly,

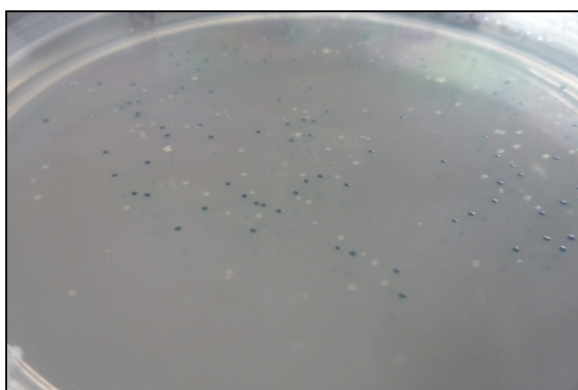
což bylo způsobeno nepřítomností genu $\text{bla}_{\text{Ap}}^{\text{R}}$ pro syntézu β -laktamázy, který zajišťuje rezistenci k ampicilinu.

Pro ověření této modro-bíle selekce byly bílé kolonie bakterií použity jako templát pro PCR. Kolonie byly převedeny sterilním párátkem z agarů, přeneseny na novou Petriho misku s pevným LB médiem a následně hrotem párátky převedeny do předpřipraveného PCR mastermixu.

Reakční směs pro PCR měla celkový objem 25 μl a obsahovala:

- 19,75 μl sterilní ddH_2O
- 2,5 μl *10x Dream Taq buffer* (finální koncentrace 1x; ThermoFisherScientific)
- 0,5 μl každého dNTP (zásobní roztok 10 mM; finální koncentrace 0,1 mM; ThermoFisherScientific)
- 1 μl reverzního primeru (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM) – tab. 3.
- 1 μl forwardového primeru (zásobní roztok 10 μM ; finální koncentrace 0,2 μM) – tab. 3.
- 0,25 μl *DreamTaq™ DNA Polymerase* (zásobní roztok 5 U/ μl ; finální koncentrace 1 U/ μl ; ThermoFisherScientific).

PCR reakce probíhala při následujících podmínkách: 94 °C 2 min; 35 cyklů: denaturace 94 °C 30 s, annealing při teplotě dle použitých párů primerů (tab. 3) 30 s, extenze 72 °C 45 s; konečná extenze 72 °C 7 min.



Obrázek 3. Narostlé kolonie bakterií. Na misce lze pozorovat modré a bílé kolonie bakterií. Bílé kolonie byly testovány pomocí PCR na přítomnost požadovaného fragmentu genu.

Následovala separace PCR produktů pomocí horizontální agaróзовé elektroforézy a jejich vizualizace společně se standardem molekulové hmotnosti (*O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* případně *O'RangeRuler™ 20 bp DNA Ladder*; ThermoFisherScientific). Podrobný

protokol je uveden v kapitole 4.1.3.5. Pokud byly na výsledném elektroforeogramu přítomné fragmenty s námi predikovanou velikostí, byly kolonie bakterií použity pro další analýzy. Pokud nebyl na elektroforeogramu patrný žádný signál či fragment velikostně neodpovídal našim požadavkům, byly tyto testované bakterie z pokusu vyřazeny. Klony bakterií obsahující specifický insert byly následně využity pro izolaci plazmidů.

4.2.4.3.1.4. Izolace plazmidů

15 ml roztoku LB media zahřátého na teplotu 37 °C bylo převedeno spolu s 15 µl ampicilinu (100 mg/ml) do 50 ml uzavíratelných zkumavek. Poté se jedna bakteriální kolonie nesoucí ve svém plazmidu požadovaný insert sterilním párátkem převedla z Petriho misky do zkumavky. Ta byla inkubována ve 37 °C, za mírného třepání (600 RPM), po dobu 12 hod.

Poté následovala izolace plazmidů, která byla prováděna pomocí *GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich Co.). 4 ml bakteriálního roztoku byly postupně převedeny do mikrozkuavky a centrifugovány (12 000 g, 1 min, 21 °C). Supernatant byl odstraněn a peleta obsahující bakteriální buňky byla resuspendována v 200 µl *Resuspension Solution*, do kterého byl před použitím přidán 1 µl *RNase A Solution*. Následně bylo do mikrozkuavky přidáno 200 µl *Lysis Solution* a mikrozkuavka byla ihned mírně promíchána převrácením v ruce. Po přidání 350 µl *Neutralization/Binding Solution* byl roztok opět jemně promíchán a následovala centrifugace (12 000 g, 10 min, 21 °C). V průběhu centrifugace byla *GenElute Miniprep Binding column* vložena do mikrozkuavky, na filtr kolonky bylo přidáno 500 µl *Column Preparation Solution* a následovala centrifugace (12 000 g, 1 min, 21 °C). Poté byl odstraněn supernatant, do kolonky se přenesla suspenze z předchozího kroku a následovala centrifugace (12 000 g, 1 min, 21 °C). Po odstranění supernatantu bylo do mikrozkuavky přidáno 500 µl *Optional Wash Solution* a opět následovala centrifugace (12 000 g, 1 min, 21 °C). Po odstranění supernatantu bylo přidáno do kolonky 750 µl *Wash Solution* a mikrozkuavka byla centrifugována (12 000 g, 1 min, 21 °C). Po opětovném odstranění supernatantu následovala centrifugace „na sucho“ (12 000 g, 2 min, 21 °C). Kolonka byla umístěna do nové mikrozkuavky a bylo do ní přidáno 50 µl sterilní ddH₂O. Po centrifugaci (12 000 g, 1 min, 21 °C) byl vzorek uskladněn při -21 °C v mrazicím boxu anebo rovnou použit pro další analýzy.

4.2.4.3.1.5. Linearizace plazmidů

Reakce probíhala v reakční směsi o objemu 20 μl a její složení bylo následující:

- 6 μl sterilní ddH₂O
- 2 μl 10x Buffer TangoTM with BSA (ThermoFisherScientific)
- 2 μl Bam HI restričního enzymu (zásobní roztok 10 U/ μl ; finální koncentrace 2 U/ μl ; ThermoFisherScientific)
- 10 μl plazmidové DNA (100 ng/ μl).

Inkubace probíhala ve 37 °C 5 hod, poté byl do směsi přidán 1 μl restričního enzymu Bam HI (zásobní roztok 10 U/ μl ; finální koncentrace 2 U/ μl ; ThermoFisherScientific) a inkubace probíhala další 2 hodiny. Linearizované plazmidy byly uchovávány v mrazicím boxu při -21 °C anebo ihned použity pro další analýzy.

4.2.4.3.1.6. Purifikace plazmidů od restriktáz a následná kontrola plazmidů

Ke vzorku linearizovaného plazmidu bylo přidáno:

- 1/20 objemu vzorku 0,5 M EDTA
- 1/10 objemu vzorku 3 M octanu sodného
- dvojnásobný objem vzorku absolutního etanolu.

Reakční směs byla umístěna do mrazicího boxu (-21 °C) na 1 hod, poté následovala centrifugace (13000 g, 15 min, 21 °C), po které byl odstraněn supernatant. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 500 μl 70% etanolu a po promíchání následovala opět centrifugace (13000 g, 10 min, 21 °C). Po odstranění supernatantu byla peleta inkubována 10 min. při laboratorní teplotě a následně resuspendována v 50 μl sterilní ddH₂O.

25 μl každého vzorku bylo vizualizováno pomocí horizontální agarózové elektroforézy spolu se standardem molekulové hmotnosti (GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder; ThermoFisherScientific). Podrobný protokol je uveden v kapitole 4.1.3.5. Požadovaná DNA byla z gelu skalpelem vyříznuta a poté byla provedena purifikace DNA pomocí QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Nejdříve byl vyříznutý fragment z gelu umístěn do mikrozkuhavky a zvážen. Poté byl do mikrozkuhavky přidán Buffer QG o třech objemech hmotnosti vyříznutého gelového nosiče (100 mg odpovídalo 100 μl). Vzniklá suspenze byla umístěna na

10 min do 50 °C a každé 3 min byla v ruce promíchána. Pak byl do mikrozkušavky přidán isopropanol ve stejném objemu jako byla hmotnost vyříznutého gelového nosiče (100 mg odpovídalo 100 µl) a suspenze byla opět promíchána. Suspenze byla převedena do mikrozkušavky v níž byla umístěna kolonka a následovala centrifugace (1 min, 17 900 g, 21 °C). Poté byla odstraněna vodní fáze a do kolonky bylo přidáno 500 µl *QG Buffer*. Vzorek byl opět centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C) a vodní fáze byla odstraněna. Poté bylo přidáno 750 µl *PE Buffer* a mikrozkušavka byla 3 min inkubována při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek opět centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C). Vodní fáze byla odstraněna a následovala centrifugace „na sucho“ (1 min, 17 900 g, 21 °C). Po opětovném odstranění vodní fáze bylo přidáno přímo na membránu 30 µl sterilní ddH₂O a kolonka byla umístěna do mikrozkušavky a vzorek byl centrifugován (1 min, 17 900 g, 21 °C). Poté byla suspenze převedena znovu na membránu a byla 3 min inkubována při laboratorní teplotě. Následovala konečná centrifugace (1 min, 17 900 g, 21 °C). Purifikovaný vzorek DNA byl použit pro další postup či byl uchováván v mrazicím boxu při -21 °C.

4.2.4.3.2. Získání fragmentů RNA na tvorbu standardní křivky

4.2.4.3.2.1. Transkripce plazmidové DNA na RNA

Přepis DNA probíhal od T3 plazmidového promotoru a byl proveden pomocí *MEGAscript[®] Kit, High Yield Transcription Kit* (Applied Biosystems). Reakce probíhala ve směsi o objemu 20 µl, která měla následující složení:

- X µl sterilní ddH₂O
- 2 µl ATP
- 2 µl UTP
- 2 µl CTP
- 2 µl GTP
- 2 µl *10x Reaction Buffer*
- 2 µl *Enzym Mix*
- 1 µg plazmidové DNA.

Vzorek byl inkubován ve 37 °C, po dobu 6 hod. Poté byl uchováván při -21 °C v mrazicím boxu anebo hned použit pro další analýzy.

4.2.4.3.2.2. Purifikace RNA od plazmidové DNA

Reakce byla provedena pomocí *DNA-freeTM Kit, DNase Treatment and Removal Reagents* (Life Technologies). Vzorek byl smíchán s *10x DNase Buffer I* (1/10 objemu vzorku) a 0,5 μ l *rDNase I*. Poté byla mikrozkušavka promíchána a inkubována ve 37 °C po dobu 30 min. Následně bylo ke vzorku znovu přidáno 0,5 μ l *rDNase I* a následovala inkubace ve 37 °C 30 min. V dalším kroku byl ke směsi přidán *DNase Inactivation Reagent* (1/10 objemu vzorku). Směs byla promíchána a ponechána v pokojové teplotě po dobu 2 min. Následovala centrifugace (10 000 g, 2 min, 21 °C) a supernatant s RNA byl převeden do nové mikrozkušavky.

4.2.4.3.2.3. Stanovení množství fragmentů RNA ve vzorku

Koncentrace RNA ve vzorku byla určena spektrofotometricky pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoScientific, USA) při vlnové délce 260 nm ($A_{260} = 1$: koncentrace celkové RNA je 40 μ g/ml). Obdržená koncentrace RNA (mg/l) byla vydělena molekulární hmotností známého fragmentu RNA ($nA \times 329,2 + nU \times 306,2 + nC \times 305,2 + nG \times 345,2 + 159$). Výsledná molarita vzorku po vynásobení Avogadrovou konstantou ($6,023 \times 10^{23}$) poskytla informaci o přibližném množství molekul RNA ve vzorku.

4.2.4.3.3. Optimalizace standardní křivky

Vzorky se známým množstvím molekul RNA byly postupně desetinasobně naředěny a použity do qRT-PCR, aby mohla být stanovena efektivita standardní křivky ($E = \text{slope} = -1/\log$), která by měla nabývat hodnot 95 – 100 %. Aby bylo těchto hodnot dosaženo, byl vybrán optimální rozsah ředění. U standardní křivky bylo nutné stanovit i spolehlivost R^2 , která by se měla blížit 100 %. Stanovovala se při každém jednotlivém běhu qRT-PCR. Na stanovení těchto hodnot byl použit CFX ManagerTM software (Biorad) dodaný přímo výrobcem k přístroji CFX96 TouchTM (Biorad).

4.2.4.4. Kvantifikace qRT-PCR

Samotná reakce proběhla podle postupu uvedeného již v kapitole 4.1.4.3, ale ke vzorkům, negativní a pozitivní kontrole byly přidány ještě standardy v dupletech. Ty umožnily vytvoření standardní křivky a tím i samotnou kvantifikaci.

Vyhodnocení reakce bylo provedeno pomocí CFX ManagerTM software (Biorad), který podle naměřených hodnot C_T stanovil počáteční množství RNA vláken ve vzorku ve vztahu ke standardní křivce. Zároveň software stanovil spolehlivost (R^2) a efektivitu (E) reakce.

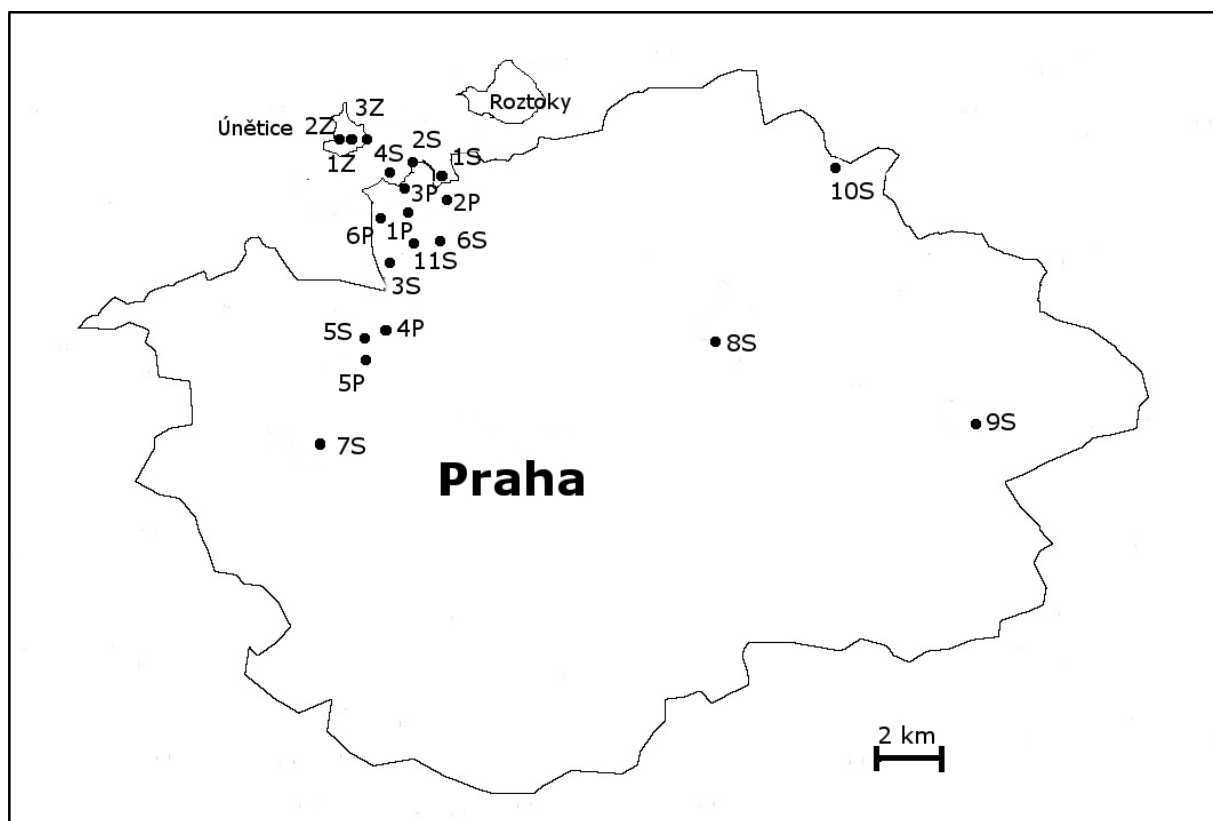
4.2.4.5. Stanovení referenčního genu na kontrolu transkripce RNA v rostlině

U vzorků RNA, které byly používány ke kvantifikaci sledovaných virů pomocí real-time RT-PCR, byla provedena kontrola, zda transkripce RNA probíhá v rostlině stabilně. Nejdříve byl zvolen referenční gen, který by měl být v rostlině transkribován ve stálém množství. V našich pokusech byl použit gen elongačního faktoru-1 alfa (Elongation factor-1 alpha, ELF1A). U vzorků RNA bylo následně kvantifikováno množství zmíněného genu v průběhu vegetace pomocí qRT-PCR, dle protokolu uvedeného v kapitole 4.1.4.3, za použití již dříve navržených primerů (Jarošová a Kundu, 2010). Nutností bylo také navržení standardní křivky pro gen ELF1A. Podrobný protokol uveden v kapitole 4.2.4.3.

4.3. Monitoring vybraných virů

Výskyt ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV byl v letech 2012 až 2015 monitorován převážně na jabloních. Jednalo se o jabloně z výsadby starých sadů z období okolo 2. sv. války a ze zahrad z 80. let především z Prahy a okolí (tab. 4 a obr. 4; tab. I, kapitola Přílohy). V případě zahrad byly většinou otestovány všechny jabloně, u sadů bylo dle jejich velikosti náhodně vybráno několik jedinců (řádově se u méně rozsáhlých sadů jednalo o jednotky stromů, u větších sadů pak o desítky stromů). Dále bylo na přítomnost studovaných virů testováno 46 planých volně rostoucích jabloní z okolí Prahy. Do monitoringu byly zahrnuty i jabloně starých kulturních odrůd ze školky na jižní Moravě nedaleko Uherského Brodu. V rámci monitoringu byla testována na přítomnost studovaných virů i řada dalších rostlin z čeledi *Rosaceae*, *Corylaceae*, *Sapindaceae* a *Betulaceae*, které by mohly být pro viry hostitelské (tab. 4). Přednostně byly odebírány vzorky s příznaky viróz, ale naprostá většina vzorků byla bez příznaků.

Obrázek 4. Lokality v Praze a okolí, v nichž byl proveden monitoring ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní. Označení lokalit uvedeno v tab. I, kapitola Přílohy.



Pro detekci byly využívány především listy. Odebrané vzorky byly uchovávány v ledničce případně v mrazicím boxu v závislosti na množství vzorků a rychlosti jejich zpracování.

Viry byly v rostlinném materiálu detekovány dvěma metodami. V jarním a brzkém letním období byla většinou používána metoda RT-PCR, přesný postup uveden v kapitole 4.1.3. V pozdějších obdobích vegetace byla použita technika qRT-PCR, jejíž postup je popsán v kapitole 4.1.4.

Tabulka 4. Hostitelské rostliny testované na přítomnost ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v průběhu let 2013 až 2015.

Hostitelská rostlina	Lokalita	Typ výsadby	Počet vzorků
jabloň	Únětice	zahrada 1	25
	Únětice	zahrada 2	9
	Únětice	zahrada 3	4
	Praha (Vinoř)	sad	5
	Praha (Běchovice)	sad	9
	Praha (Vysočany)	sad	3
	Praha (Motol)	sad	7
	Praha (Sedlec)	sad	2
	Praha (Vokovice)	sad	11
	Praha (Kozí hřbety)	sad	13
	Praha (Lysolaje)	sad	17
	Tiché Údolí - Roztoky	sad	8
	Praha (Suchdol) - Roztoky	sad	13
	Praha (Suchdol)	sad	6
	Uherský Brod	školka	57
	viz tab. I, kapitola Přílohy	volně rostoucí	46
	Celkem		235
	kdouloň	Uherský Brod	sad
Žabčice		sad	9
Podyjí		sad	11
Slup		sad	3
Bílé Karpaty		sad	5
Celkem			38
mišpule	Uherský Brod	sad	15
hrušeň	Praha (Troja)	sad	3
slivoň	Praha (Troja)	sad	12
aronie	Praha (Troja)	sad	4
líška	Praha (Troja)	sad	12
bříza	Praha (Suchdol)	okrasná	4
skalník	Praha (Suchdol)	okrasná	4
kdoulovec	Praha (Suchdol)	okrasná	5
hloh	Praha (Suchdol)	okrasná	7
	Únětice	okrasná	2
	Celkem		9
jírovec	Praha (Suchdol)	okrasná	5
bez	Statenice-Černý Vůl	volně rostoucí	5
Celkem vzorků			351

4.4. Studium molekulární variability

4.4.1. Výběr izolátů

Pro studium molekulární variability bylo vybráno deset izolátů ApMV, devět izolátů ASGV a ASPV a osm izolátů ACLSV (tab. 5). U každého studovaného viru pocházely tři vybrané izoláty ze tří odrůd jabloní (Bohemia, Topaz, Angold) ze soukromé zahrady v Úněticích, které vykazovaly směsnou infekci všemi čtyřmi viry. Další izoláty byly vybrány náhodně ze sadů, zahrad a volně rostoucích stromů.

Tabulka 5. Izoláty ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV z jabloní, které byly vybrány na sekvenaci.

N/A – informace nejsou známy; XX – není vyobrazeno na mapě

Izolát/ ref.č. v NCBI	Odrůda	Typ výsadby	Lokalita	GPS souřadnice	Označení
ApMV iso1/ LT574866	Bohemia	zahrada	Únětice	50.14931, 14.3605	1Z
ApMV iso2/ LT574867	Topaz	zahrada	Únětice	50.14906, 14.36077	1Z
ApMV iso3/ LT574868	Angold	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	1Z
ApMV iso4/ LT574869	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ApMV iso5/ LT574870	N/A	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	3Z
ApMV iso6/ N/A	Hammersteinovo	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx
ApMV iso7/ N/A	Sikulské	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx
ApMV iso8/ N/A	Borovinka	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx
ApMV iso9/ LT574871	N/A	volně rostoucí	Praha (Kozí Hřbety u kapličky)	50.14468, 14.37078	1P
ApMV iso10/ LT574872	N/A	sad	Praha (Lysolaje – Housle)	50.12506, 14.36532	3S
ASGV iso1/ LT574873	Bohemia	zahrada	Únětice	50.14931, 14.3605	1Z
ASGV iso2/ LT574874	Topaz	zahrada	Únětice	50.14906, 14.36077	1Z
ASGV iso3/ LT574875	Angold	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	1Z
ASGV iso4/ LT574876	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ASGV iso5/ LT574877	N/A	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	3Z
ASGV iso6/ LT574878	N/A	volně rostoucí	Praha (Údolí Únětického potoka)	50.14613, 14.37337	3P
ASGV iso7/ LT574879	N/A	volně rostoucí	Praha (Kozí Hřbety u kapličky)	50.14468, 14.37078	1P
ASGV iso8/ LT574880	N/A	volně rostoucí	Praha (Kozí Hřbety u kapličky)	50.14468, 14.37078	1P

Tabulka 5. Pokračování

Izolát/ ref.č. v NCBI	Odrůda	Typ výsadby	Lokalita	GPS souřadnice	Označení
ASGV iso9/ LT574881	N/A	sad	Praha (Lysolaje – Housle)	50.12506, 14.36532	3S
ASPV iso1/ LT574882	Bohemia	zahrada	Únětice	50.14931, 14.3605	1Z
ASPV iso2/ LT574883	Topaz	zahrada	Únětice	50.14906, 14.36077	1Z
ASPV iso3/ LT574884	Angold	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	1Z
ASPV iso4/ N/A	Sikulské	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx
ASPV iso5/ N/A	Borovinka	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx
ASPV iso6/ LT574885	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ASPV iso7/ LT574886	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ASPV iso8/ LT574887	N/A	sad	Praha (Tiché Údolí)-Roztoky	50.14995, 14.38651	1S
ASPV iso9/ LT574888	N/A	volně rostoucí	Praha (Kozí Hřbety u kapličky)	50.14468, 14.37078	1P
ACLSV iso1/ LT574889	Bohemia	zahrada	Únětice	50.14931, 14.3605	1Z
ACLSV iso2/ LT574890	Topaz	zahrada	Únětice	50.14906, 14.36077	1Z
ACLSV iso3/ LT574891	Angold	zahrada	Únětice	50.14951, 14.36011	1Z
ACLSV iso4/ LT574892	N/A	sad	Praha (Tiché Údolí)-Roztoky	50.14995, 14.38651	1S
ACLSV iso5/ LT574893	N/A	sad	Praha (Tiché Údolí)-Roztoky	50.14995, 14.38651	1S
ACLSV iso6/ LT574894	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ACLSV iso7/ LT574895	N/A	sad	Praha (Suchdol)-Roztoky	50.15061, 14.37397	2S
ACLSV iso8/ N/A	Limburské	školka	Uherský Brod	49.04144, 17.79323	xx

4.4.2. Příprava vzorků na sekvenaci

4.4.2.1. Příprava vzorků

Příprava vzorků probíhala dle protokolu uvedeného v kapitole 4.2.4.3.1.1., avšak v PCR reakci byly použity primery uvedené v tab. 6.

Tabulka 6. Primery použité při přípravě vybraných vzorků na sekvenaci. FP – forwardový primer; RP – reverzní primer.

Virus	Autor	Název	Typ	Sekvence	Teplota annealingu	Délka fragmentu
ApMV	Petrzik a Lenz, 2002	87E5	FP	5'-GGCCATTAGCGACGATTAGTC-3'	57 °C	821 bp
		87E6	RP	5'-ATGCTTTAGTTCCCTCTCCGG-3'		
ACLSV	Menzel <i>et al.</i> , 2002	ACLSVs	FP	5'-TTCATGGAAAGACAGGGCAA-3'	62 °C	677 bp
		ACLSVas	RP	5'-AAGCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA-3'		
ASGV	Nickel <i>et al.</i> , 2001	ASGV5641	FP	5'-ATGAGTTTGGAAGACGTGCTTC-3'	50 °C	755 bp
		ASGV6396	RP	5'-CTGCAAGACCGGACCAAGTTT-3'		
ASPV	Schwarz a Jelkmann, 1998	ASPV7956	FP	5'-ATGACTTCCAATGGATCCCA-3'	55 °C	391 bp
	Komorowska <i>et al.</i> , 2010	ASPDEL	RP	5'-CCCCACCATAAGCAGTGCCAGTTTCAA-3'		

4.4.2.2. Ligace pomocí StrataClone PCR Cloning Kit

Postup ligace je popsán v kapitole 4.2.4.3.1.2.

4.4.2.3. Kontrola bakteriálních klonů

Kontrola bakteriálních klonů probíhala dle protokolu uvedeného již v kapitole 4.2.4.3.1.3. V PCR reakci však byly použity primery popsané v tab. 6.

4.4.2.4. Izolace plazmidů

Izolace plazmidů je popsána v kapitole 4.2.4.3.1.4.

4.4.3. Analýza sekvencí

Získané plazmidy byly komerčně osekvenovány na automatickém sekvenčním analyzátoru ve firmě GATC Biotech. Pro oboustranné sekvenování PCR produktů byly použity univerzální primery plazmidového vektoru M13R a M13F.

Získané sekvence nukleotidů byly analyzovány pomocí programu BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciences, USA) a následně porovnávány za využití BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Sekvence nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin byly porovnány mezi sebou a také

s již publikovanými sekvencemi uvedenými v databázi NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (tab. 7). Byla stanovena procentuální sekvenční identita izolátů pomocí programu BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciences, USA). Sekvenční data, použitá v naší studii, jsou zveřejněna v databázi NCBI pod referenčními čísly LT574866 – LT574895 (tab. 6).

Tabulka 7. Izoláty ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV z databáze NCBI. Uvedené nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence byly porovnávány se sekvencemi získanými v této práci.

Virus	Označení v databázi NCBI	Zdroj izolátu	Země původu	Označení v disertační práci
ApMV	AY542540.1	jabloň	Belgie	iso11 Bel
	GQ131805.1	jabloň	Brazílie	iso12 Bra
	FJ429311.1	jabloň	Indie	iso13 Ind
	AF548367.1	jabloň	Korea	iso14 Kor
ASGV	LN901426.1	jabloň	Indie	iso10 Ind
	FN599521.1	jabloň	Indie	iso11 Ind
	JX885581.1	jabloň	Čína	iso12 Chi
	JX885578.1	jabloň	Čína	iso13 Chi
ASPV	AF438522.1	jabloň	Polsko	iso10 Pol
	FJ619188.1	jabloň	Čína	iso11 Chi
	KC791788.1	jabloň	Korea	iso12 Kor
	HM125159.1	jabloň	Čína	iso13 Chi
ACLSV	AJ586642.1	jabloň	Itálie	Iso9 Ita
	AJ586641.1	jabloň	Turecko	iso10 Tur
	AJ586640.1	jabloň	Čína	iso11 Chi
	AJ586639.1	jabloň	Albánie	iso12 Alb
	GQ334197.1	jabloň	Kanada	iso13 Can

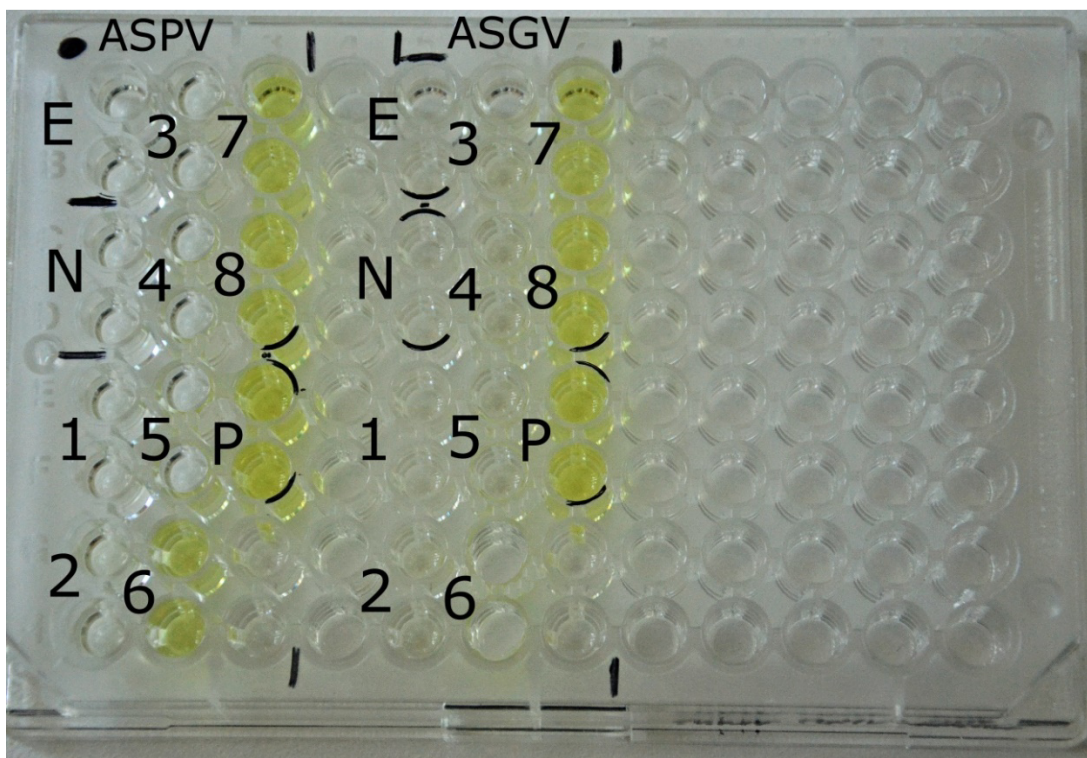
5. Výsledky

5.1. Optimalizace diagnostických metod

Za účelem optimalizace diagnostických metod byly v průběhu roku 2014 odebírány vzorky lýka, pupenů, listů a květů z pěti různých míst na pěti vybraných stromech jabloní. Z každého stromu se směsnou infekcí ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV bylo tedy získáno pět vzorků pro každý rostlinný materiál, v případě lýka a listů i opakovaně v průběhu roku.

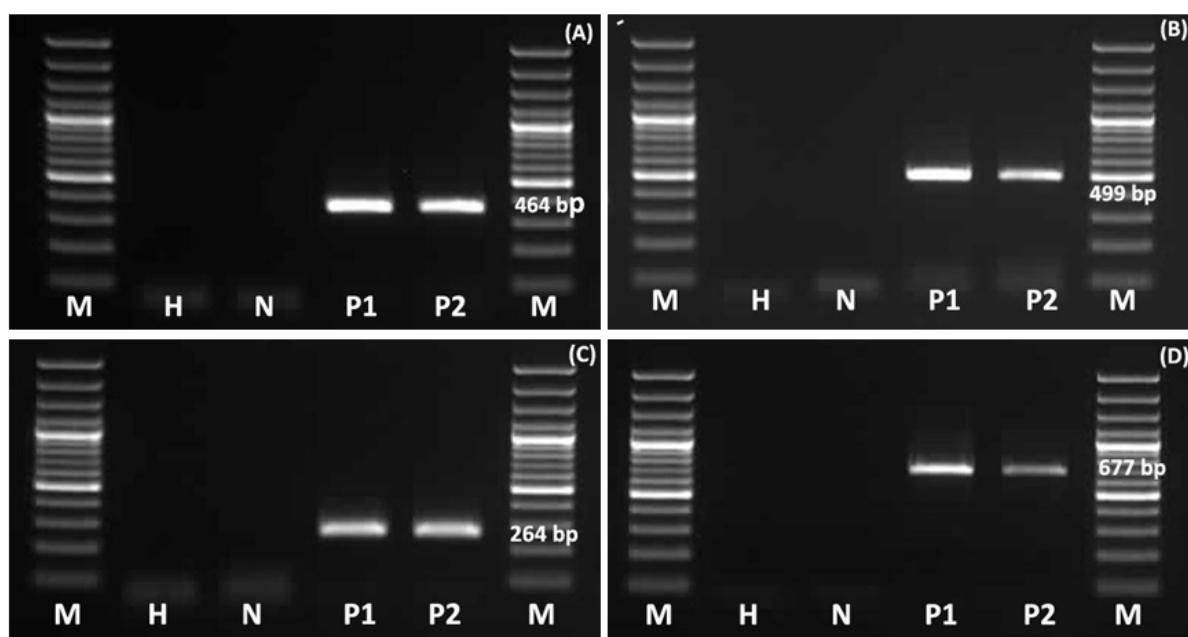
V případě metody DAS/I-ELISA byl jako negativní vzorek vyhodnocen vzorek, u kterého došlo k negativní reakci v obou opakováních, tj. jeho hodnota absorbance byla nižší nebo na úrovni použitých negativních kontrol. Jako pozitivní vzorek byl vyhodnocen takový vzorek, jehož hodnota absorbance byla u obou opakování vyšší (tj. více než dvojnásobná), než je průměrná hodnota absorbance negativní kontroly plus trojnásobek její směrodatné odchylky (obr. 5).

Obrázek 5. Detekce ASGV a ASPV metodou DAS-ELISA. Výsledek testu DAS-ELISA na mikrotitrační destičce, kde bylo testováno osm vzorků na přítomnost ASGV a ASPV. Vzorky 7 a 8 byly vyhodnoceny jako pozitivní na přítomnost obou virů a vzorek 6 byl pozitivní pouze na ASPV. E – extrakční pufr v dupletu; N – negativní kontrola v dupletu; P – pozitivní kontrola v dupletu; 1-8 – vzorky v dupletech.



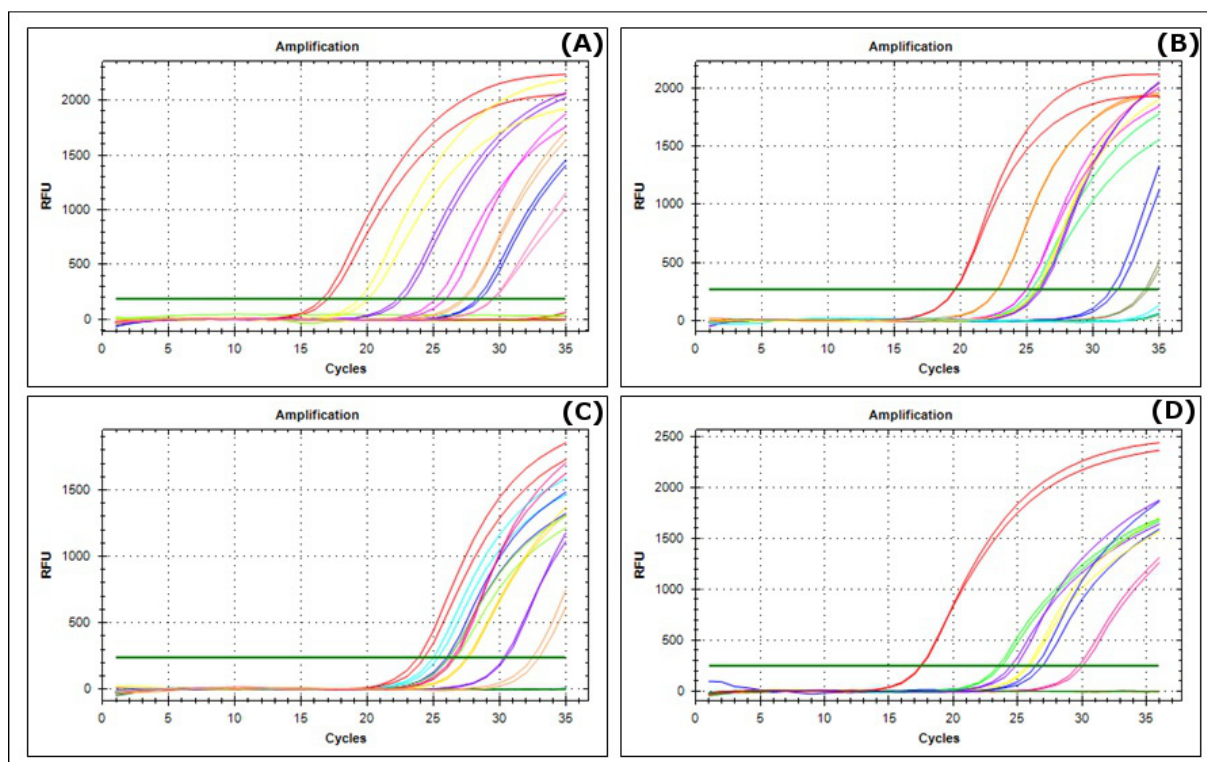
U metody RT-PCR byl jako pozitivní vzorek vyhodnocen ten, u něhož bylo možné na elektroforeogramu pozorovat fragment o stejné délce jako u pozitivní kontroly. Jako negativní vzorek byl vyhodnocen ten, kde nebyl pozorován žádný fragment anebo fragment neodpovídal délkově (obr. 6).

Obrázek 6. Detekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou RT-PCR. Zobrazeny jsou výsledné elektroforeogramy získané při detekci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV pomocí specifických primerů navržených pro účely RT-PCR; (A): 161Z8/161Z9 (464 bp); (B): ASGVUs/ASGV2as (499 bp); (C): ASPCs/ASPas (264 bp) a (D): ACLSVF1/ACLSV1R (432 bp). (M): DNA marker (*O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*; ThermoFisherScientific); (H): negativní kontrola ddH₂O; (N): negativní kontrola získaná z viruprosté jabloně; (P1) a (P2): RT-PCR produkty získané z ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV infikovaných jabloní. Agarózový gel barvený etidium bromidem.



Výsledkem qRT-PCR reakce bylo rozlišení pozitivních a negativních vzorků, podle toho, zda byla či nebyla zaznamenána přítomnost vyzářené fluorescence (obr. 7).

Obrázek 7. Detekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou qRT-PCR. Vyobrazen příklad výsledků qRT-PCR při detekci (A): ApMV; (B): ASGV; (C): ASPV; (D): ACLSV. V případě pozitivních vzorků došlo k vyzáření fluorescence, což se na výsledném grafu projevilo rostoucí křivkou, zatímco u negativních vzorků k vyzáření fluorescence nedošlo a křivky těchto vzorků zůstaly v průběhu reakce na úrovni 0. RFU (relative fluorescence unit) – relativní fluorescenční jednotka.



U získaných vzorků bylo následně sledováno, u kolika testovaných vzorků se infekce jednotlivými viry danou detekční metodou potvrdila (tab. II, III, IV a V, kapitola Přílohy). Tímto způsobem byla stanovena spolehlivost dané metody v průběhu roku v různém rostlinném materiálu. V případě, že byla přítomnost viru potvrzena ve čtyřech až pěti vzorcích z pěti testovaných (60 - 100 %), byla metoda považována za spolehlivou. V případě detekce viru ve dvou a méně vzorcích (0 – 40 %) byla metoda označena jako nespolehlivá (tab. 8) a nelze ji v tomto období nebo u tohoto rostlinného materiálu doporučit pro rutinní testování. V případě hodnot mezi 40 až 60 % byla metoda považována za spolehlivou, ale vzorek by měl být odebírán ze stromu rovnoměrně, z více než 3 míst na stromě.

Testováním vzorků v průběhu roku se ukázalo, že nejspolehlivější metodou pro detekci všech čtyř sledovaných virů je technika qRT-PCR. Tato metoda potvrdila výskyt ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v průběhu celého roku a i u vzorků z různého rostlinného materiálu.

K drobným nuancím došlo pouze u testů na přítomnost ASPV u listů a květů, ale úspěšnost se i v těchto případech pohybovala okolo 70 %.

Pro detekci ApMV a ASGV se jako spolehlivá potvrdila i metoda RT-PCR, která u těchto virů poskytla celoročně dobré výsledky (64 – 100 %) a bylo možné ji použít i pro detekci patogenů v různých rostlinných orgánech. Tato technika se však neprokázala jako dostatečně spolehlivá pro detekci ACLSV v jarním období bez ohledu na použitý rostlinný materiál (28 – 68 %). Také při detekci ASPV z listů a květů nebyly dosažené výsledky přesvědčivé (24 – 68 %).

Naopak sérologickou techniku ELISA bylo možné pro detekci ASPV a ACLSV z různých rostlinných orgánů použít v průběhu celého roku (64 – 100 %). Ke konci vegetačního období se ale snížila detekovatelnost virů z listů u ASPV na 40 % a u ACLSV na 12 %. Tato technika se však ukázala jako zcela nevhodná pro detekci ApMV a ASGV z lýka, a to v průběhu celého roku. Také u listů bylo její použití omezeno, v případě ApMV pouze na jarní období (100 %) a u ASGV na jaro a brzké léto (92 %). Podrobněji jsou výsledky shrnuty v příložené tab. 8 a v tab. II, III, IV a V (kapitola Přílohy).

Na základě získaných dat byla vypracována tab. 9, která shrnuje spolehlivost jednotlivých detekčních metod dle doby odběru vzorku a druhu rostlinného materiálu. Z ní vyplývá, že ideálním materiálem pro detekci virů jsou listy odebrané v průběhu června. V nich lze viry spolehlivě detekovat všemi metodami.

Tabulka 8. Procentuální spolehlivost detekčních metod (ELISA, RT-PCR, qRT-PCR). Tabulka zobrazuje v kolika procentech vzorků, bylo možné virus detekovat v daném rostlinném materiálu zvolenou diagnostickou metodou v různých obdobích roku.

Virus	Rostlinný materiál	Termín odběru	Detekční metoda			
			ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	
ApMV	pupeny	III.	96 %	88 %	96 %	
		IV.	16 %	88 %	100 %	
	lýko	VI.	56 %	96 %	100 %	
		IX.	0 %	88 %	100 %	
		XII.	0 %	64 %	80 %	
		IV.	100 %	100 %	100 %	
	listy	VI.	60 %	100 %	100 %	
		IX.	8 %	100 %	100 %	
		IV.	100 %	100 %	100 %	
	květy	IV.	100 %	100 %	100 %	
	ASGV	pupeny	III.	96 %	96 %	100 %
			IV.	48 %	64 %	100 %
lýko		VI.	4 %	88 %	100 %	
		IX.	24 %	100 %	100 %	
		XII.	0 %	100 %	100 %	
		IV.	92 %	100 %	100 %	
listy		VI.	92 %	96 %	100 %	
		IX.	12 %	100 %	100 %	
		IV.	75 %	92 %	100 %	
květy		IV.	75 %	92 %	100 %	
ASPV		pupeny	III.	88 %	84 %	88 %
			IV.	100 %	92 %	100 %
	lýko	VI.	96 %	100 %	100 %	
		IX.	100 %	96 %	100 %	
		XII.	100 %	92 %	100 %	
		IV.	92 %	48 %	76 %	
	listy	VI.	100 %	56 %	96 %	
		IX.	40 %	68 %	92 %	

Tabulka 8. Pokračování.

Virus	Rostlinný materiál	Termín odběru	Detekční metoda		
			ELISA	RT-PCR	qRT-PCR
ASPV	květy	IV.	80 %	24 %	68 %
	pupeny	III.	100 %	48 %	100 %
ACLSV	lýko	IV.	100 %	68 %	100 %
		VI.	64 %	92 %	100 %
		IX.	84 %	84 %	100 %
		XII.	100 %	72 %	100 %
	listy	IV.	84 %	28 %	92 %
		VI.	100 %	72 %	100 %
		IX.	12 %	84 %	100 %
	květy	IV.	100 %	48 %	100 %

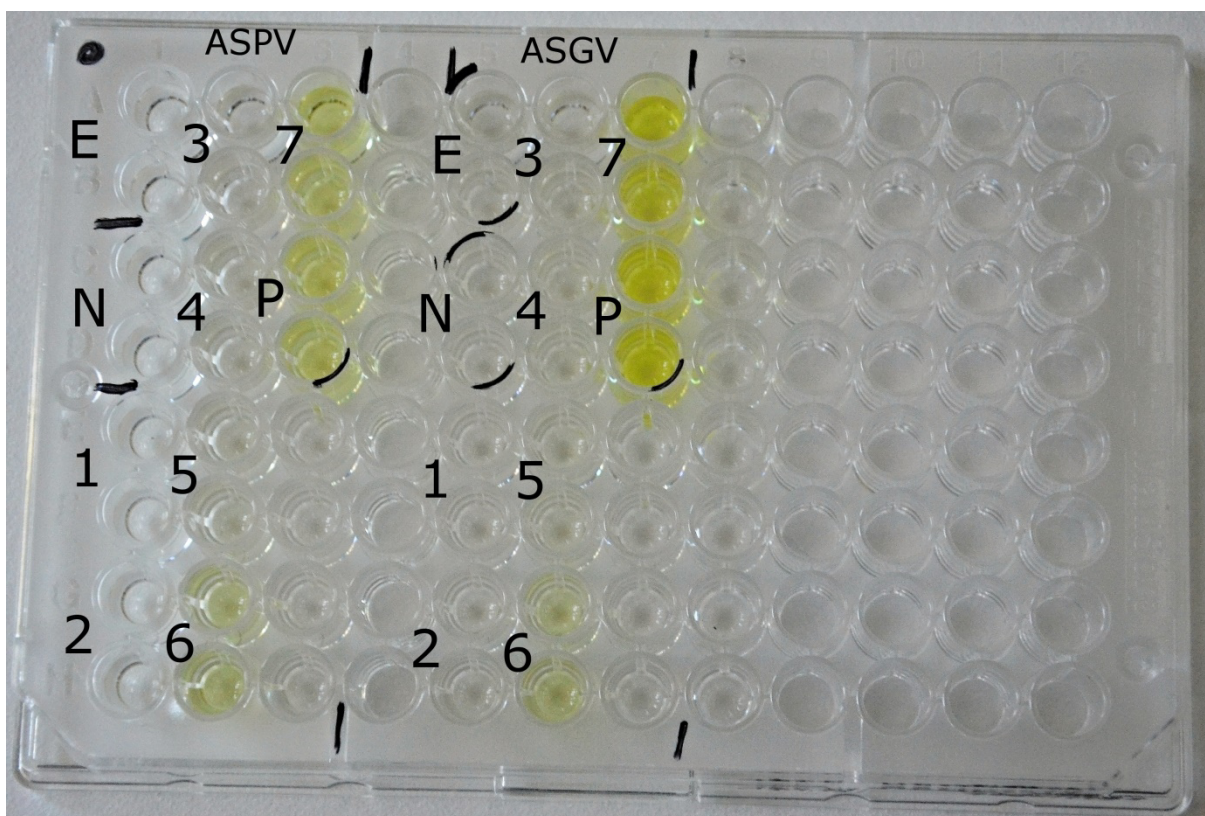
Tabulka 9. Grafické znázornění spolehlivosti detekčních metod (ELISA, RT-PCR, qRT-PCR). Tabulka zobrazuje, kdy a v jakém rostlinném materiálu je možné virus spolehlivě detekovat zvolenou diagnostickou technikou. (+) označuje pozitivní výsledek/ (-) označuje negativní výsledek.

Rostlinný materiál	Termín odběru	Pupeny	Květy	Listy			Lýko				
		III.	IV.	IV.	VI.	IX.	IV.	VI.	IX.	XII.	
Virus	Technika										
	ApMV	DASI-ELISA	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
qRT-PCR		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ASGV	DAS-ELISA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	RT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	qRT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ASPV	DAS-ELISA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	RT-PCR	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
	qRT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ACLSV	DAS-ELISA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
	RT-PCR	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	qRT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

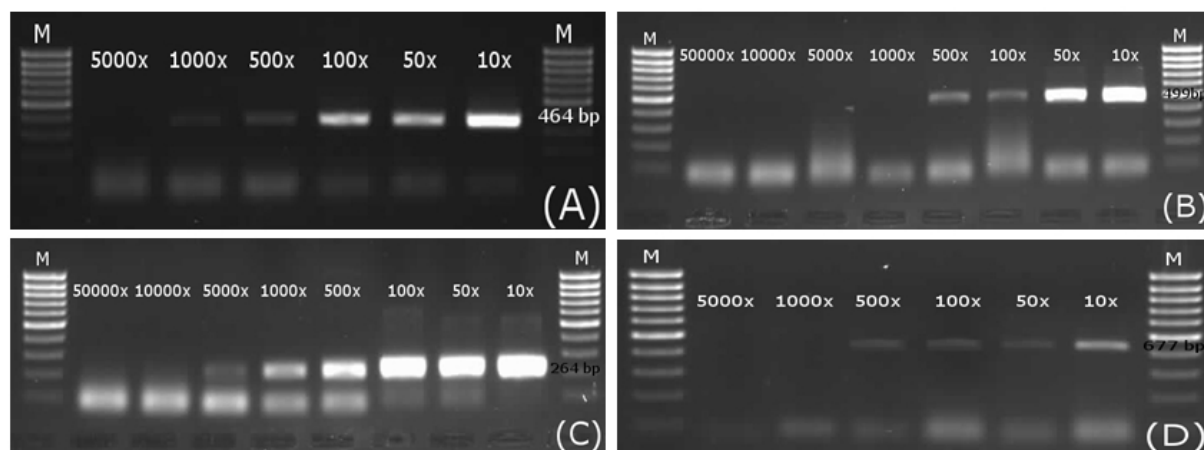
5.2. Kvantifikace virů

Při kvantifikaci virů bylo nutné, jak již bylo popsáno v metodice, postupovat různými způsoby. V případě metod DAS/I-ELISA a RT-PCR byla kvantifikace provedena na základě ředících řad. Množství viru v rostlině bylo vyjádřeno relativně na základě schopnosti detekovat virus ve vzorku o známém ředění (obr. 8 a 9).

Obrázek 8. Výsledek testu DAS-ELISA při relativní kvantifikaci ASGV a ASPV. Na mikrotitrační destičce je ukázka kvantifikace jednoho vzorku. E – extrakční pufr v dupletu; N – negativní kontrola v dupletu; P – pozitivní kontrola v dupletu; 7 – ředění 20x v dupletu; 6 – ředění 50x v dupletu; 5 – ředění 100x v dupletu; 4 – ředění 500x v dupletu; 3 – ředění 1 000x v dupletu; 2 – ředění 5 000x v dupletu; 1 – ředění 10 000x v dupletu.



Obrázek 9. Výsledek testu RT-PCR při relativní kvantifikaci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. Zobrazeny elektroforeogramy ředění jednoho vzorku; (A): ApMV, (B): ASGV, (C): ASPV a (D): ACLSV. M: DNA marker (*O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*; ThermoFisherScientific). Agarózový gel barvený etidium bromidem.



V případě metody qRT-PCR, je možné, jak už název metody napovídá, u vzorku stanovit množství viru přímo (absolutně) pomocí standardní křivky, čehož bylo v předkládané práci využito. Kvůli tomu však není možné přímé porovnávání získaných výsledků ze všech tří metod. Z tohoto důvodu jsou výsledky u každého viru rozděleny na dvě části. V první části jsou porovnávány výsledky získané metodou DAS/I-ELISA a RT-PCR a ve druhé části jsou shrnuty výsledky z metody qRT-PCR.

5.2.1. ApMV

5.2.1.1. DASI-ELISA a RT-PCR

ApMV bylo možné detekovat pomocí sérologické metody DASI-ELISA v listech od brzkého jara (březen) až do brzkého léta (červen). Hodnoty, kdy bylo virus stále možné detekovat, dosáhly u mladých listů (duben) ředění až 100 000x. V průběhu vegetace se však koncentrace viru snižovala a v červnu dosahovaly maximální možné hodnoty ředění 100x. Naproti tomu při detekci v lýku bylo možné virus detekovat pouze v červnu, a to při maximálním ředění 100x. V pupenech byl virus zachycen při ředění až 5 000x, zatímco v květech při ředění až 50 000x (tab. 10).

V případě techniky RT-PCR byla v listech nejvyšší hodnota ředění, kdy byl virus v pletivu ještě zaznamenán, zachycena také v jarních měsících (březen, duben), ale pouze při ředění 1 000x. Avšak touto technikou bylo možné virus v listech detekovat až do října, i když se snižujícími se hodnotami ředění. V lýku bylo možné virus detekovat ve všech sledovaných

měsících, ale hodnoty ředění, kdy bylo možné virus stále detekovat, dosahovaly maximálně hodnot 500x. V pupenech bylo maximální dosažené ředění 1 000x, zatímco v květech až 10 000x (tab. 10).

Obě techniky naznačily, že se titr viru v průběhu vegetace v rostlinné tkáni snižuje. Rozcházel se však v tom, v kterém rostlinném materiálu je nejvyšší množství ApMV, zda v listech (DASI-ELISA) nebo v květech (RT-PCR).

Tabulka 10. Relativní kvantifikace ApMV metodami DASI-ELISA a RT-PCR. Hodnoty maximálního ředění, při nichž byl ApMV detekován metodami DASI-ELISA a RT-PCR. Detekce byla provedena v různých rostlinných materiálech v průběhu roku. (–) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Metoda		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Odrůda	Termín odběru								
Rubín	březen	0x	100x	5000x	500x	10000x	1000x	5000x	1000x
	duben	-	-	-	-	10000x	1000x	-	-
	květen	-	-	-	-	5000x	500x	-	-
	červen	100x	500x	-	-	100x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	0x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	100x	-	-
	září	0x	500x	-	-	-	50x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	10x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	10x	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	20x	100x	5000x	1000x	50000x	1000x	10000x	10000x
	duben	-	-	-	-	50000x	1000x	-	-
	květen	-	-	-	-	10000x	1000x	-	-
	červen	100x	500x	-	-	500x	500x	-	-
	červenec	-	-	-	-	20x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	100x	-	-
	září	0x	50x	-	-	-	50x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	50x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	50x	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	0x	100x	1000x	1000x	10000x	1000x	50000x	5000x
	duben	-	-	-	-	100000x	1000x	-	-
	květen	-	-	-	-	10000x	100x	-	-
	červen	50x	100x	-	-	100x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	0x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	100x	-	-
	září	0x	100x	-	-	-	50x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	10x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	10x	-	-	-	-	-	-

5.2.1.2. qRT-PCR

Standardní křivka pro kvantifikaci byla připravována v rozsahu 10^{10} až 10^{15} (obr. II, kapitola Přílohy). Efektivita reakcí se pohybovala od 98 do 100 %. Koeficient determinace (R^2) nabýval hodnoty přibližně 0,98 (obr. I, kapitola Přílohy). Teplota tání pro ApMV byla stanovena na 78,5 °C (obr. III, kapitola Přílohy). Nejnižší detekovatelná hladina viru byla 10^5 kopií.

Na základě dat (tab. 11) získaných metodou qRT-PCR bylo možné pozorovat, že v průběhu vegetace (březen-říjen) docházelo v listech k poklesu titru ApMV. V jarním období byl obsah viru v hodnotách 10^{14} kopií, zatímco na podzim 10^{11} . Obdobnou fluktuaci bylo možné pozorovat i u lýka, kde bylo však nejvyšších koncentrací viru dosaženo většinou až v červnu. Absolutně nejvyšší koncentrace viru byly naměřeny v květech a to v hodnotách 10^{15} .

Tabulka 11. Absolutní kvantifikace ApMV metodou qRT-PCR.

Ct - cyclus treshold; SQ - standard quantification; (-) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Odrůda	Termín odběru	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ
Rubín	březen	18,16	$2,64 \times 10^{14}$	18,55	$3,91 \times 10^{14}$	19,03	$1,56 \times 10^{14}$	-	-
	duben	-	-	-	-	16,80	$9,17 \times 10^{14}$	15,2	$2,22 \times 10^{15}$
	květen	-	-	-	-	17,33	$4,48 \times 10^{14}$	-	-
	červen	26,01	$1,06 \times 10^{12}$	-	-	20,66	$6,34 \times 10^{13}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	27,10	$1,84 \times 10^{12}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	28,72	$6,68 \times 10^{11}$	-	-
	září	27,85	$1,26 \times 10^{12}$	-	-	29,55	$7,01 \times 10^{11}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	29,87	$1,15 \times 10^{10}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	29,19	$4,66 \times 10^{11}$	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	20,33	$5,17 \times 10^{13}$	19,42	$2,99 \times 10^{14}$	18,28	$2,54 \times 10^{14}$	-	-
	duben	-	-	-	-	16,35	$1,77 \times 10^{15}$	17,08	$8,40 \times 10^{14}$
	květen	-	-	-	-	16,78	$9,67 \times 10^{14}$	-	-
	červen	18,23	$2,88 \times 10^{14}$	-	-	19,16	$2,18 \times 10^{14}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	24,05	$3,04 \times 10^{12}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	25,78	$4,84 \times 10^{12}$	-	-
	září	23,13	$7,83 \times 10^{12}$	-	-	28,06	$8,17 \times 10^{11}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	29,77	$5,94 \times 10^{11}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	28,75	$7,06 \times 10^{11}$	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	28,61	$1,06 \times 10^{12}$	21,38	$7,673 \times 10^{13}$	19,71	$8,42 \times 10^{13}$	-	-
	duben	-	-	-	-	16,18	$1,17 \times 10^{15}$	14,88	$3,68 \times 10^{15}$
	květen	-	-	-	-	17,40	$5,89 \times 10^{14}$	-	-
	červen	18,49	$2,71 \times 10^{14}$	-	-	19,27	$1,28 \times 10^{14}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	26,21	$1,04 \times 10^{13}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	27,23	$2,55 \times 10^{12}$	-	-
	září	22,01	$2,14 \times 10^{13}$	-	-	28,04	$1,06 \times 10^{12}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	29,09	$8,31 \times 10^{11}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	28,36	$8,31 \times 10^{11}$	-	-	-	-	-	-

5.2.2. ASGV

5.2.2.1. DAS-ELISA a RT-PCR

V případě ASGV nebyla detekce metodou DAS-ELISA příliš spolehlivá. V lýku nebylo možné virus detekovat s výjimkou června, ale i tak ve velmi nízkém ředění 50x. U listů bylo období, kdy byla přítomnost viru potvrzena, také velice krátké, pouze od března do května.

Titř viru byl nejvyšší v březnu a dosáhl hodnoty až 5 000x. Virus bylo možné detekovat také v pupenech, ale nepodařilo se ho detekovat touto metodou v květech. Naměřený titř viru byl u pupenů 100x.

V případě metody RT-PCR byla detekce viru výrazně spolehlivější. V lýku bylo možné virus zachytit celoročně a hodnoty ředění byly až 1 000x, a to v červnu. V listech byl virus detekovatelný po celé vegetační období (březen-říjen). Hodnoty ředění se pohybovaly v rozmezí 100x až 5 000x. Nižší hodnoty byly naměřeny v březnu, pak stoupaly přibližně do července a pak zaznamenaly opět pokles.

Obě tyto metody naznačily, že titř viru v listech a lýku během roku fluktoval a nejvyšší byl v létě. Co se týká obsahu viru v jednotlivých rostlinných orgánech, na základě získaných výsledků (tab. 12), nelze potvrdit, že by zde byly výrazné rozdíly.

Tabulka 12. Relativní kvantifikace ASGV metodami DAS-ELISA a RT-PCR. Zobrazeny jsou dosažené maximální hodnoty ředění, při nichž bylo možné ASGV detekovat metodou DAS-ELISA a RT-PCR v různých rostlinných materiálech v průběhu roku. (–) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Metoda		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Odrůda	Termín odběru								
Rubín	březen	0x	50x	1000x	100x	1000x	500x	-	-
	duben	-	-	-	-	100x	1000x	0x	500x
	květen	-	-	-	-	100x	500x	-	-
	červen	0x	500x	-	-	0x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	0x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	100x	-	-
	září	0x	100x	-	-	-	500x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	500x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	100x	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	0x	100x	100x	100x	5000x	100x	-	-
	duben	-	-	-	-	500x	100x	0x	100x
	květen	-	-	-	-	500x	500x	-	-
	červen	50x	1000x	-	-	50x	1000x	-	-
	červenec	-	-	-	-	0x	1000x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	1000x	-	-
	září	0x	50x	-	-	-	1000x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	500x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	50x	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	0x	100x	100x	50x	1000x	100x	-	-
	duben	-	-	-	-	500x	1000x	0x	50x
	květen	-	-	-	-	500x	500x	-	-
	červen	20x	1000x	-	-	20x	1000x	-	-
	červenec	-	-	-	-	0x	5000x	-	-
	srpen	-	-	-	-	0x	1000x	-	-
	září	0x	100x	-	-	-	1000x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	1000x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	0x	100x	-	-	-	-	-	-

5.2.2.2. qRT-PCR

Standardní křivka pro kvantifikaci byla připravována v rozsahu 10^{10} až 10^{16} (obr. II, kapitola Přílohy). Efektivita reakcí se pohybovala od 99 do 100 %. Koeficient determinace (R^2) nabýval hodnoty přibližně 0,98 (obr. I, kapitola Přílohy). Teplota tání pro ASGV byla stanovena na 73,5 °C (obr. III, kapitola Přílohy). Nejnižší detekovatelná hladina viru byla 10^5 kopií.

Na základě výsledků (tab. 13) získaných metodou qRT-PCR, lze říci, že ke změnám v obsahu ASGV v různém rostlinném materiálu, ani v průběhu vegetace nedošlo. Drobný

rozptyl hodnot byl pozorován u listů, kde se přibližně od května do července zvyšovaly naměřené koncentrace viru (z hodnot 10^{13} na 10^{14}).

Tabulka 13. Absolutní kvantifikace ASGV metodou qRT-PCR.

Ct - cyclus treshold; SQ - standard quantification; (-) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Odrůda	Termín odběru	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ
Rubín	březen	25,36	1,44x10 ¹³	24,42	4,02x10 ¹³	23,63	7,41x10 ¹³	-	-
	duben	-	-	-	-	21,63	3,45x10 ¹⁴	22,24	2,15x10 ¹⁴
	květen	-	-	-	-	21,74	3,18x10 ¹⁴	-	-
	červen	25,44	1,84x10 ¹³	-	-	23,24	1,00x10 ¹⁴	-	-
	červenec	-	-	-	-	23,32	9,42x10 ¹³	-	-
	srpen	-	-	-	-	24,51	3,75x10 ¹³	-	-
	září	25,23	1,55x10 ¹³	-	-	25,12	1,76x10 ¹³	-	-
	říjen	-	-	-	-	25,23	1,60x10 ¹³	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	25,31	2,02x10 ¹³	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	25,60	1,65x10 ¹³	24,19	4,79x10 ¹³	23,59	7,66x10 ¹³	-	-
	duben	-	-	-	-	20,94	5,87x10 ¹⁴	21,87	2,87x10 ¹⁴
	květen	-	-	-	-	22,05	2,49x10 ¹⁴	-	-
	červen	22,89	1,31x10 ¹⁴	-	-	22,61	1,63x10 ¹⁴	-	-
	červenec	-	-	-	-	23,13	1,09x10 ¹⁴	-	-
	srpen	-	-	-	-	23,26	9,83x10 ¹³	-	-
	září	24,54	2,81x10 ¹³	-	-	23,42	8,67x10 ¹³	-	-
	říjen	-	-	-	-	24,54	2,91x10 ¹³	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	25,27	1,44x10 ¹³	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	24,19	4,80x10 ¹³	25,30	2,04x10 ¹³	23,44	8,56x10 ¹³	-	-
	duben	-	-	-	-	21,86	2,90x10 ¹⁴	21,54	3,70x10 ¹⁴
	květen	-	-	-	-	21,90	2,80x10 ¹⁴	-	-
	červen	23,82	6,37x10 ¹³	-	-	22,32	2,04x10 ¹⁴	-	-
	červenec	-	-	-	-	22,54	1,71x10 ¹⁴	-	-
	srpen	-	-	-	-	23,06	1,15x10 ¹⁴	-	-
	září	24,01	5,53x10 ¹³	-	-	24,01	5,53x10 ¹³	-	-
	říjen	-	-	-	-	25,11	1,60x10 ¹³	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	25,49	2,83x10 ¹²	-	-	-	-	-	-

5.2.3. ASPV

5.2.3.1. DAS-ELISA a RT-PCR

Sérologickou metodou DAS-ELISA bylo možné detekovat ASPV v lýku celoročně a v listech po celou dobu vegetace. V lýku byla hodnota ředění stabilní a dosahovala hodnoty 100x. V listech bylo této hodnoty dosaženo pouze v jarních měsících. Poté ředění klesalo, až dosáhlo hodnoty 20x. V pupenech a květech byl virus detekován při ředění 100x.

Metodou RT-PCR byl virus také detekován ve všech druzích rostlinného materiálu (tab. 14). V pupenech a květech byl ASPV detekován při ředění přibližně 1 000x. V listech a lýku hodnoty ředění fluktovaly v průběhu vegetace, případně roku. U obou typů materiálu bylo maximální ředění zaznamenáno v září (u listů byly hodnoty ředění 1 000x, u lýka 5 000x).

U obou sledovaných metod lze pozorovat, že docházelo ke změnám koncentrace viru v průběhu vegetace v listech. U lýka byla tato tendence patrná pouze u techniky RT-PCR. Na základě získaných dat nebylo možné prokázat rozdíly v obsahu viru v jednotlivých rostlinných materiálech.

Tabulka 14. Relativní kvantifikace ASPV metodami DAS-ELISA a RT-PCR. Zobrazeny dosažené maximální hodnoty ředění, při nichž bylo možné ASPV detekovat metodou DAS-ELISA a RT-PCR v různých rostlinných materiálech v průběhu roku. (–) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Metoda		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Odrůda	Termín odběru								
Rubín	březen	100x	500x	100x	500x	100x	100x	100x	1000x
	duben	-	-	-	-	100x	1000x	-	-
	květen	-	-	-	-	100x	100x	-	-
	červen	100x	500x	-	-	50x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	50x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	50x	1000x	-	-
	září	100x	5000x	-	-	50x	1000x	-	-
	říjen	-	-	-	-	20x	500x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	100x	100x	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	100x	500x	500x	1000x	100x	500x	100x	1000x
	duben	-	-	-	-	100x	1000x	-	-
	květen	-	-	-	-	500x	500x	-	-
	červen	100x	1000x	-	-	50x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	50x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	20x	1000x	-	-
	září	100x	5000x	-	-	50x	1000x	-	-
	říjen	-	-	-	-	20x	500x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	100x	100x	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	100x	500x	100x	5000x	100x	100x	100x	100x
	duben	-	-	-	-	100x	100x	-	-
	květen	-	-	-	-	50x	100x	-	-
	červen	100x	1000x	-	-	50x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	50x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	50x	500x	-	-
	září	100x	1000x	-	-	20x	500x	-	-
	říjen	-	-	-	-	20x	100x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	100x	50x	-	-	-	-	-	-

5.2.3.2. qRT-PCR

Standardní křivka pro kvantifikaci byla připravována v rozsahu 10^7 až 10^{15} (obr. II, kapitola Přílohy). Efektivita reakcí se pohybovala od 98 do 100 %. Koeficient determinace (R^2) nabýval hodnoty přibližně 0,99 (obr. I, kapitola Přílohy). Teplota tání pro ASPV byla

stanovena na 77 °C (obr. III, kapitola Přílohy). Nejnižší detekovatelná hladina viru byla 10^4 kopií.

Metodou qRT-PCR byla stanovena stabilní hodnota ASPV v rostlinách. Pohybovala se v hodnotách 10^{8-9} kopií v listech po celou dobu vegetace. V lýku hladina viru byla celoročně 10^9 , stejně jako v pupenech a květech na jaře.

Z výsledků, které jsou uvedeny v tab. 15, vyplývá, že k fluktuaci ASPV v průběhu roku ani mezi různými typy rostlinného materiálu nedocházelo.

Tabulka 15. Absolutní kvantifikace ASPV metodou qRT-PCR.

Ct - cyclus treshold; SQ - standard quantification; (-) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Odrůda	Termín odběru	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ
Rubín	březen	25,61	$7,68 \times 10^{08}$	25,20	$9,55 \times 10^{08}$	25,46	$7,97 \times 10^{08}$	-	-
	duben	-	-	-	-	28,32	$1,06 \times 10^{08}$	22,65	$5,78 \times 10^{09}$
	květen	-	-	-	-	26,42	$4,05 \times 10^{08}$	-	-
	červen	21,69	$1,14 \times 10^{10}$	-	-	24,32	$1,78 \times 10^{09}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	25,15	$9,90 \times 10^{08}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	26,33	$4,30 \times 10^{08}$	-	-
	září	25,64	$7,51 \times 10^{08}$	-	-	26,05	$5,66 \times 10^{08}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	26,11	$5,44 \times 10^{08}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	27,92	$1,57 \times 10^{08}$	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	23,61	$3,02 \times 10^{09}$	24,60	$1,46 \times 10^{09}$	22,86	$4,97 \times 10^{09}$	-	-
	duben	-	-	-	-	25,44	$8,09 \times 10^{08}$	23,61	$2,93 \times 10^{09}$
	květen	-	-	-	-	24,00	$2,22 \times 10^{09}$	-	-
	červen	23,13	$4,11 \times 10^{09}$	-	-	24,75	$1,31 \times 10^{09}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	25,2	$9,57 \times 10^{08}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	26,08	$5,53 \times 10^{08}$	-	-
	září	23,73	$1,68 \times 10^{09}$	-	-	26,91	$3,15 \times 10^{08}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	26,44	$4,33 \times 10^{08}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	24,35	$1,82 \times 10^{09}$	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	24,84	$1,30 \times 10^{09}$	24,76	$1,31 \times 10^{09}$	23,23	$3,82 \times 10^{09}$	-	-
	duben	-	-	-	-	25,47	$7,87 \times 10^{08}$	22,85	$5,00 \times 10^{09}$
	květen	-	-	-	-	25,05	$1,06 \times 10^{09}$	-	-
	červen	24,08	$2,10 \times 10^{09}$	-	-	24,95	$1,14 \times 10^{09}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	26,17	$5,22 \times 10^{08}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	26,01	$5,81 \times 10^{08}$	-	-
	září	24,22	$1,18 \times 10^{09}$	-	-	27,41	$2,24 \times 10^{08}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	27,35	$2,33 \times 10^{08}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	24,50	$9,65 \times 10^{08}$	-	-	-	-	-	-

5.2.4. ACLSV

5.2.4.1. DAS-ELISA a RT-PCR

ACLSV bylo možné sérologicky detekovat celoročně v lýku. Dosažené maximální možné ředění viru bylo přibližně 100x s mírným poklesem v červnu. V listech byl virus

detekovatelný od března do srpna. Ředění na začátku vegetace dosahovalo hodnot až 5 000x, poté klesalo a v srpnu mělo hodnotu jen 20x. Přítomnost viru bylo možné také prokázat v pupenech a květech. Ředění, při kterém byl ACLSV detekován v pupenech, mělo hodnotu zhruba 500x. V květech byl virus zachycen při nejvyšším ředění, a to až 10 000x.

V případě metody RT-PCR bylo v lýku možné virus potvrdit také celoročně, ale při nižších hodnotách ředění (10x až 50x), zatímco v listech bylo možné virus detekovat až od dubna přibližně do října. Hodnoty ředění se u listů během jara postupně navyšovaly až na hodnotu 100x (500x), která byla stálá během léta a pak během podzimu ředění kleslo na hodnotu 10x. V pupenech bylo možné virus detekovat při ředění 50x. V květech byl virus potvrzen opět při nejvyšších hodnotách ředění, u této metody to bylo při hodnotách 500x.

Oběma metodami se ukázalo (tab. 16), že docházelo ke změnám obsahu viru v listech v průběhu vegetace. Také byly pozorovány rozdíly v množství viru v jednotlivých rostlinných materiálech. Nejvyšší titr viru byl zaznamenán v květech, nejnižší naopak v lýku.

Tabulka 16: Relativní kvantifikace ACLSV metodou DAS-ELISA a RT-PCR. Zobrazeny dosažené maximální hodnoty ředění, při nichž bylo možné ACLSV detekovat metodou DAS-ELISA a RT-PCR v různých rostlinných materiálech v průběhu roku. (–) označuje, že v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Metoda		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Odrůda	Termín odběru								
Rubín	březen	100x	10x	100x	50x	1000x	0x	10000x	500x
	duben	-	-	-	-	500x	50x	-	-
	květen	-	-	-	-	1000x	50x	-	-
	červen	50x	50x	-	-	100x	50x	-	-
	červenec	-	-	-	-	100x	100x	-	-
	srpen	-	-	-	-	20x	100x	-	-
	září	100x	50x	-	-	0x	50x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	10x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	50x	50x	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	50x	10x	500x	50x	1000x	0x	5000x	500x
	duben	-	-	-	-	1000x	100x	-	-
	květen	-	-	-	-	1000x	500x	-	-
	červen	20x	10x	-	-	100x	100x	-	-
	červenec	-	-	-	-	500x	500x	-	-
	srpen	-	-	-	-	50x	500x	-	-
	září	100x	50x	-	-	0x	50x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	10x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	100x	10x	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	100x	10x	1000x	50x	1000x	10x	5000x	50x
	duben	-	-	-	-	500x	100x	-	-
	květen	-	-	-	-	5000x	100x	-	-
	červen	50x	10x	-	-	100x	50x	-	-
	červenec	-	-	-	-	100x	100x	-	-
	srpen	-	-	-	-	50x	100x	-	-
	září	100x	50x	-	-	20x	10x	-	-
	říjen	-	-	-	-	-	10x	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	100x	10x	-	-	-	-	-	-

5.2.4.2. qRT-PCR

Standardní křivka pro kvantifikaci byla připravována v rozsahu 10^6 až 10^{14} (obr. II, kapitola Přílohy). Efektivita reakcí se pohybovala od 98 do 100 %. Koeficient determinace (R^2) nabýval hodnoty přibližně 0,99 (obr. I, kapitola Přílohy). Teplota tání pro ACLSV byla stanovena na 76 °C (obr. III, kapitola Přílohy). Nejnižší detekovatelná hladina viru byla 10^4 kopií.

Obsah ACLSV v lýku byl během roku v rozmezí hodnot 10^8 - 10^{11} a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány v červnu, po zbytek roku bylo množství viru stálé. V případě listů byly během

vegetace zaznamenány hodnoty v rozpětí 10^9 - 10^{11} a k nárůstu došlo v průběhu dubna až června. V pupenech byla hladina viru 10^9 , což odpovídalo množství v listech a v lýku ve stejném období. Nejvyšší naměřené hodnoty byly získány z květů, a to 10^{12} kopií.

Výsledky (tab. 17) z metody qRT-PCR potvrdily, že k mírné fluktuaci viru v listech a lýku v průběhu vegetace docházelo. Nárůst koncentrace viru se v obou případech objevuje koncem jara až začátkem léta. Na základě obdržených dat lze také konstatovat, že nejvyšší obsah viru byl v květech.

Tabulka 17. Absolutní kvantifikace ACLSV metodou qRT-PCR.

Ct - cyclus treshold; SQ - standard quantification; (-) v daném měsíci nebylo měření provedeno.

Rostlinný materiál		Lýko		Pupeny		Listy		Květy	
Odrůda	Termín odběru	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ	Ct	SQ
Rubín	březen	22,15	$3,15 \times 10^{09}$	22,28	$2,87 \times 10^{09}$	22,49	$2,48 \times 10^{09}$	-	-
	duben	-	-	-	-	21,40	$7,90 \times 10^{10}$	15,58	$3,89 \times 10^{12}$
	květen	-	-	-	-	19,96	$1,48 \times 10^{11}$	-	-
	červen	22,92	$2,53 \times 10^{10}$	-	-	21,02	$9,05 \times 10^{10}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	22,55	$2,39 \times 10^{09}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	21,71	$4,27 \times 10^{09}$	-	-
	září	23,21	$1,51 \times 10^{09}$	-	-	21,51	$4,91 \times 10^{09}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	22,79	$2,01 \times 10^{09}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	22,49	$2,48 \times 10^{09}$	-	-	-	-	-	-
Bohemia	březen	24,95	$4,47 \times 10^{08}$	21,71	$4,26 \times 10^{09}$	20,69	$9,43 \times 10^{10}$	-	-
	duben	-	-	-	-	18,45	$4,17 \times 10^{11}$	15,16	$5,11 \times 10^{12}$
	květen	-	-	-	-	20,91	$1,12 \times 10^{11}$	-	-
	červen	19,34	$3,31 \times 10^{11}$	-	-	20,98	$9,84 \times 10^{10}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	21,75	$4,15 \times 10^{09}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	21,39	$5,35 \times 10^{09}$	-	-
	září	23,60	$2,45 \times 10^{09}$	-	-	20,94	$7,32 \times 10^{09}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	21,41	$5,29 \times 10^{09}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	23,56	$1,18 \times 10^{09}$	-	-	-	-	-	-
Topaz	březen	22,81	$1,98 \times 10^{09}$	20,78	$8,17 \times 10^{09}$	21,98	$5,45 \times 10^{10}$	-	-
	duben	-	-	-	-	20,59	$9,72 \times 10^{10}$	15,04	$7,46 \times 10^{12}$
	květen	-	-	-	-	19,33	$3,38 \times 10^{11}$	-	-
	červen	21,27	$9,33 \times 10^{10}$	-	-	19,68	$2,59 \times 10^{11}$	-	-
	červenec	-	-	-	-	20,52	$9,82 \times 10^{09}$	-	-
	srpen	-	-	-	-	21,61	$4,58 \times 10^{09}$	-	-
	září	22,46	$5,39 \times 10^{09}$	-	-	20,20	$1,23 \times 10^{10}$	-	-
	říjen	-	-	-	-	19,36	$2,21 \times 10^{10}$	-	-
	listopad	-	-	-	-	-	-	-	-
	prosinec	21,60	$4,61 \times 10^{09}$	-	-	-	-	-	-

5.3. Monitoring vybraných virů

Nejhojněji byly v provedeném monitoringu zastoupeny jabloně (69 %). Ostatní rostlinné druhy (hrušně, aronie, břízy, skalníky, kdoulovce, jírovce a bezy byly přítomny v přibližně 1 %, s výjimkou hlohů (2,5 %) mišpulí (4,2 %), slivoň (3,3 %), lísek (3,3 %) a kdouloní (11 %).

Ze všech testovaných rostlin (tab. 18) se virovou infekci podařilo prokázat pouze na stromech jabloní. Na ostatních hostitelských rostlinách (116 vzorků) se výskyt virů nepotvrdil, což může souviset s jejich nižším zastoupením v monitoringu (celkem 31 %).

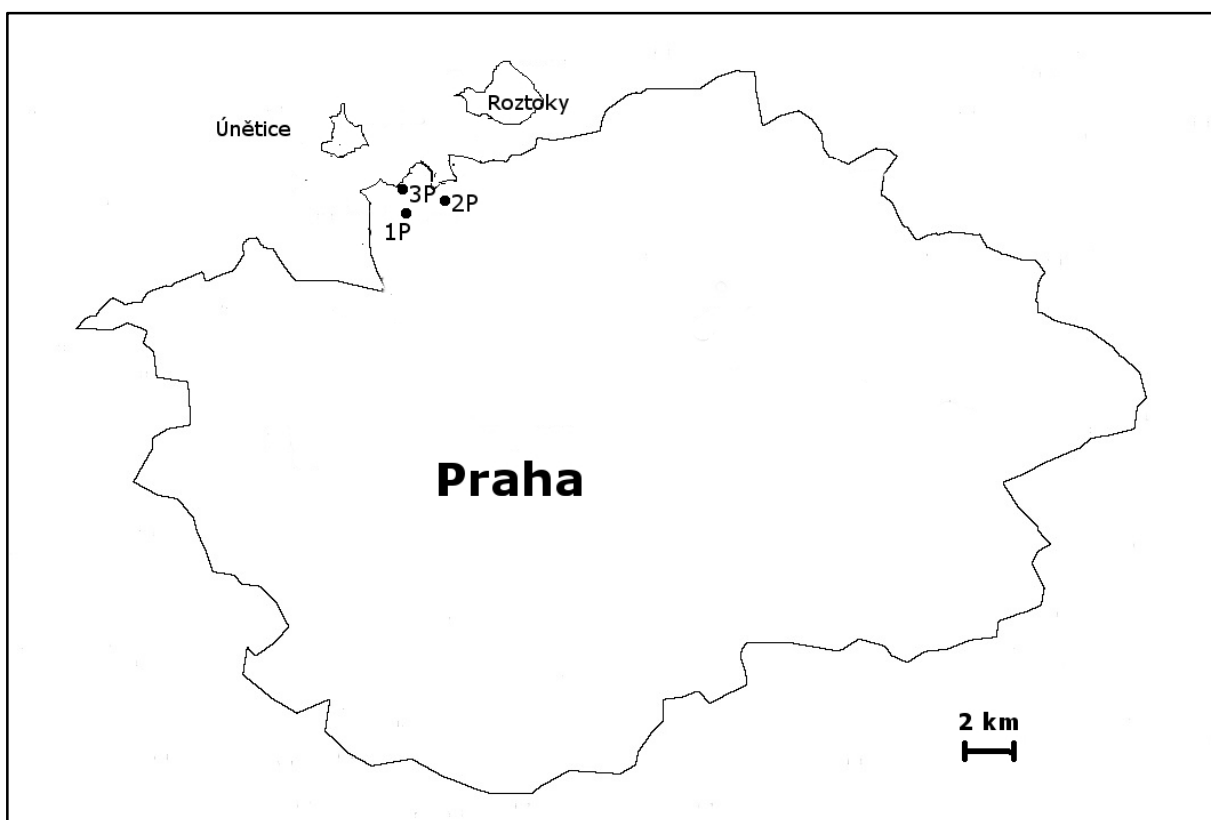
Tabulka 18. Celková míra infekce ApMV, ASGV, ASPV, a ACLSV u testovaných rostlin.

Hostitelská rostlina	Počet testovaných rostlin	Počet rostlin infikovaných virem					Počet zdravých rostlin
		ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV	směsná	
jabloň	235	40	96	142	149	145	68
kdouloň	38	0	0	0	0	0	38
mišpule	15	0	0	0	0	0	15
hrušeň	3	0	0	0	0	0	3
slivoň	12	0	0	0	0	0	12
aronie	4	0	0	0	0	0	4
líška	12	0	0	0	0	0	12
bříza	4	0	0	0	0	0	4
skalník	4	0	0	0	0	0	4
kdoulovec	5	0	0	0	0	0	5
hloh	9	0	0	0	0	0	9
jírovec	5	0	0	0	0	0	5
bez	5	0	0	0	0	0	5
Celkem	351	40	96	142	149	145	184

Z 235 testovaných jabloní byla infekce alespoň jedním virem prokázána u 167 stromů (71 %). Přítomnost všech testovaných virů byla výrazně vyšší u vzorků odebraných z jabloní ze zahrad a sadů, než v případě vzorků získaných z volně rostoucích stromů jabloní (tab. 19). Mezi nejčastěji vyskytující se virus v sadech patřil ACLSV (72 %), stejně jako v zahradách, kde však míra jeho infekce byla stejná s ASPV (76 %). Naopak u volně rostoucích stromů jabloní se přítomnost ACLSV neprokázala. V kulturních výsadbách byl nejméně rozšířen ApMV, konkrétně v zahradách infikoval 14 vzorků (37 %) a v sadech 15 stromů (16 %). U

volně rostoucích jabloní nebyla přítomnost žádného z virů vyšší než 9 % (ASPV) a infikované stromy jsou znázorněny na obr. 10.

Obrázek 10. Lokality s volně rostoucími jabloněmi infikovanými ApMV, ASGV a ASPV. Mapa zobrazuje, ve kterých lokalitách testovaných volně rostoucích jabloní, byly nalezeny pozitivní vzorky na některý ze studovaných virů. V lokalitě 1P nalezeny 2 pozitivní vzorky: 1x ASGV, 1x ApMV, ASGV a ASPV. V 2P pouze jeden pozitivní vzorek (ASPV). V lokalitě 3P nalezeny 2 pozitivní vzorky: 1x ASPV a 1x ASGV spolu s ASPV.



Směsná infekce se vyskytovala ve 145 případech (62 %). Směsné infekce byly velice rozšířeny v sadech a zahradách, ale zatímco v sadech převažovaly infekce třemi a dvěma viry (tab. VI, kapitola Přílohy), v zahradách se vyskytovaly rovnoměrně infekce dvěma až čtyřmi viry. V případě směsné infekce dvěma viry byly více rozšířeny kombinace ASGV a ASPV, ASGV a ACLSV nebo ASPV a ACLSV, stejně tak u infekce třemi viry byla více zastoupena varianta s uvedenými viry než směsná infekce s APMV. U volně rostoucích jabloní byl poměr jednotlivých a směsných infekcí rovnoměrný. (tab. VII, kapitola Přílohy).

V sadu z jižní Moravy nedaleko Uherského Brodu bylo testováno 57 stromů jabloní, jednalo se o široké spektrum starých odrůd, které byly na dvou různých podnožích (semenáč,

A2). Na těchto stromech byla zaznamenána vysoká míra virové infekce (tab. VIII, kapitola Přílohy). Nejvíce byl rozšířen ACLSV u 91 % vzorků, následován ASPV s 84 % napadených stromů, dále ASGV s potvrzenou infekcí u 42 % jabloní a nejméně rozšířeným virem byl ApMV (18 %). Jedinou zjištěnou zcela zdravou odrudou byla Jadernička moravská.

Tabulka 19. Celková míra infekce ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní. Data jsou rozdělena dle typu výsadby (sady, zahrady, volně rostoucí jabloně a školka).

Počet / % - představuje množství vzorků infikovaných virem.

Jabloně	Lokalita	Infekce (Počet / %)				Celkem testovaných rostlin	
		ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV		
Školka	Uherský Brod	10 18 %	24 42 %	48 84 %	52 91 %	57	
	Tiché Údolí - Roztoky	0 0 %	0 0 %	7 88 %	5 63 %	8	
	Suchdol - Roztoky	5 38 %	11 85 %	12 92 %	13 100 %	13	
	Lysolaje - Housle	1 6 %	11 65 %	11 65 %	11 65 %	17	
	Kozí Hřbety	3 23 %	7 54 %	3 23 %	12 92 %	13	
	Vokovice - Na Krutci	0 0 %	5 45 %	8 73 %	7 64 %	11	
	Sady	Sedlec	0 0 %	1 50 %	2 100 %	2 100 %	2
		Motol – Nad Kalvárií	0 0 %	2 29 %	5 71 %	6 86 %	7
		Vysočany - Klíčany	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	3
		Běchovice - U Stacha	2 22 %	5 56 %	9 100 %	9 100 %	9
Vinoř - Ctěnický zámek		0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	5	
Suchdol		4 67 %	4 67 %	4 67 %	3 50 %	6	
Celkem sady		15 16 %	46 49 %	61 65 %	68 72 %	94	
Zahrady	Zahrada 1 - Únětice	12 48 %	18 72 %	22 88 %	23 92 %	25	
	Zahrada 2 - Únětice	1 11 %	2 22 %	3 33 %	2 22 %	9	
	Zahrada 3 - Únětice	1 25 %	3 75 %	4 100 %	4 100 %	4	
	Celkem zahrady	14 37 %	23 61 %	29 76 %	29 76 %	38	
Volně rostoucí	1 2 %	3 7 %	4 9 %	0 0 %	46		

5.4. Studium molekulární variability

5.4.1. ApMV

Nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence izolátů ApMV byly na základě procentuální sekvenční identity porovnávány mezi sebou a také se čtyřmi vybranými izoláty ApMV z jabloní původem z Belgie, Brazílie, Indie a Koreje, které byly získány z databáze NCBI. Jednalo se o sekvence odpovídající obalovému proteinu (coat protein, CP) viru.

V případě nukleotidů se sekvenční identita mezi českými izoláty pohybovala v rozmezí od 96 do 99 % (tab. IX, kapitola Přílohy). V případě porovnání i se zahraničními izoláty nabývala sekvenční identita hodnot od 92 do 99 %. Nejvíce se od českých i ostatních zahraničních izolátů odlišovaly izoláty z Koreje a Belgie, ale nízkou sekvenční identitu vykazovaly i mezi sebou (92 %). Na úrovni aminokyselin se hodnoty pohybovaly v rozmezí intervalu 83-100 % (tab. X, kapitola Přílohy). Nejnižší sekvenční identitu s ostatními opět nabýval izolát z Koreje (83-84 %). Mezi ostatními izoláty se neobjevily tak výrazné rozdíly, sekvenční identita byla 93-100 %. Mezi českými izoláty byla ještě větší podobnost (96-100 %), avšak spodní hranice se týkala jen jednoho izolátu ze starého sadu, iso10.

Na základě sekvenční identity genu pro CP nebyla u izolátů ApMV pozorována žádná diverzita zakládající se na jejich geografickém původu, případně na typu výsadby, ze které pocházely.

5.4.2. ASGV

Nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence izolátů ASGV byly na základě procentuální sekvenční identity porovnávány mezi sebou a také se dvěma indickými a dvěma čínskými izoláty ASGV z jabloní získanými z databáze NCBI. Jednalo se o sekvence odpovídající CP viru.

V případě nukleotidů byla sekvenční identita mezi českými izoláty 99 % (tab. XI, kapitola Přílohy). Při porovnání se zahraničními izoláty měly české izoláty s indickými také sekvenční identitu 99 %. S čínskými izoláty však měly jak české, tak indické izoláty shodu jen 91-92 %, zatímco identita čínských izolátů mezi sebou byla 100 %. Na úrovni aminokyselin se hodnoty pohybovaly v rozmezí intervalu 96-100 % (tab. XII, kapitola Přílohy). Nižší podobnost s ostatními izoláty opět vykazovaly čínské izoláty (96-98 %), ale také český izolát iso7

z volně rostoucího stromu jabloně, měl s ostatními izoláty nižší sekvenční identitu, a to 96-99 %.

U ASGV se také neprojevil na základě procentuální sekvenční identity genu CP žádný vztah mezi geografickým původem izolátů, případně mezi typem výsadby, ze které byly odebírány.

5.4.3. ASPV

Nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence parciální části genu CP izolátů ASPV byly na základě procentuální sekvenční identity porovnávány mezi sebou a také s polským, korejským a dvěma čínskými izoláty ASPV z jabloní.

V případě nukleotidů se sekvenční identita mezi českými izoláty pohybovala v rozmezí 73 až 96 % (tab. XIII, kapitola Přílohy). Nejvyšší shoda byla zaznamenána mezi izolátem iso5 ze školky z jižní Moravy s izoláty iso 2 a iso3, které oba pocházejí ze stejné zahrady. Naopak nejnižší sekvenční identita byla mezi zahradním izolátem iso1 a izolátem ze starého sadu iso7. Při porovnání českých izolátů se zahraničními sekvenční identita nabývala hodnot mezi 69 až 81 %. Nejnižší podobnost byla potvrzena mezi čínským izolátem iso13 Chi a českým zahradním izolátem iso1, největší pak mezi izolátem ze starého sadu iso7 a korejským izolátem iso12 Kor. Na úrovni odvozených aminokyselin se sekvenční identita mezi českými izoláty pohybovala mezi 77 až 98 % (tab. XIV, kapitola Přílohy). Nejmenší podobnost vykazoval izolát iso7 s zahradním izolátem iso3 a největší shodu měl opět izolát iso 5 s izolátem iso2. Při srovnání i se zahraničními izoláty bylo rozpětí sekvenční identity 70 až 88 %. Nejnižší sekvenční identita byla pozorována u čínského izolátu iso13 Chi a českého zahradního izolátu iso 3, naopak největší byla zaznamenána u iso 7 s iso12 Kor, což je stejné jako v případě nukleotidů.

V případě ASPV nebyla u procentuální sekvenční identity parciální části CP potvrzena žádná diverzita mezi izoláty na základě geografického původu nebo typu výsadby jabloní, z nichž byly virové izoláty získány.

5.4.4. ACLSV

Nukleotidové a od nich odvozené aminokyselinové sekvence izolátů ACLSV byly na základě procentuální sekvenční identity porovnávány mezi sebou a také s pěti izoláty

ACLSV z jabloní původem z Itálie, Turecka, Albánie, Kanady a Číny. Jednalo se o sekvence odpovídající části CP viru.

V případě nukleotidů se identita pohybovala v rozmezí od 80 do 95 % (tab. XV, kapitola Přílohy). Nejvyšší shoda byla mezi českým izolátem iso6 ze starého sadu a tureckým izolátem iso10 Tur. Naopak nejnižší identita byla pozorována mezi zahradním izolátem iso1 a albánským izolátem iso12 Alb. Na úrovni aminokyselin CP se hodnoty pohybovaly v rozmezí intervalu 90-99 % (tab. XVI, kapitola Přílohy). Nejvyšší podobnost byla shledána opět u izolátu iso6 a iso10 Tur. Naopak nejnižší podobnost byla mezi tureckým izolátem iso10 Tur a českým izolátem iso4 ze starého sadu. Z českých izolátů měl největší shodu izolát iso7 ze starého sadu s izolátem iso8 ze školky z jižní Moravy.

U izolátů ACLSV se na základě procentuální sekvenční identity parciální části genu CP neprojevil žádný vztah mezi jejich geografickým původem nebo typem výsadby jabloní, ze které virové izoláty pocházely.

6. Diskuze

Z mnoha virů vyskytujících se na jabloních patří čtyři námi studované viry, jmenovitě ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV, mezi ekonomicky velmi významné patogeny (Desvignes, 1999), které mohou působit značné ztráty na výnosech (Campbell, 1963; Posnette, 1963; Schmidt, 1972; Zahn, 1996). Za hlavní způsob přenosu je u zmiňovaných virů považováno vegetativní množení infikovaného rostlinného materiálu. Z tohoto důvodu je dostatek spolehlivých biologických, sérologických a molekulárních metod na detekci virových patogenů v rostlinné tkáni nezbytný (Hadidi *et al.*, 2011). Jen na základě jejich spolehlivosti mohou být kontrolní strategie, mezi které patří detekce patogena, certifikace rostlinného materiálu, eradikace množitelského materiálu, šlechtění na toleranci případně rezistenci, karanténa a další, proti virovým patogenům jabloní účinné. Na tomto základě bylo v rámci předkládané disertační práce provedeno porovnávání různých detekčních metod, jmenovitě ELISA, RT-PCR a qRT-PCR.

Ze získaných dat vyplývá, že nejvhodnější je pro detekci všech čtyř virů použití metody qRT-PCR, která poskytuje celoročně a u všech testovaných rostlinných materiálů, jmenovitě u lýka, pupenů, listů a květů, spolehlivé výsledky. U zbylých dvou testovaných metod (DAS/I-ELISA a RT-PCR) se schopnost detekovat sledované viry v průběhu vegetace a v různých typech pletiv lišila a v některých případech nebylo možné viry detekovat vůbec. Změny ve spolehlivosti detekce virů těmito dvěma metodami v průběhu vegetace nebo u různých hostitelských rostlin jsou popisovány řadou autorů, avšak je komplikované určit příčinu, zda dochází ke skutečným změnám v koncentraci virů nebo se jedná o ovlivnění spolehlivosti metod inhibitory (Svoboda a Polák, 2010; Kundu, 2003a; Arntjen a Jelkmann, 2010), jejichž obsah v rostlinách se může lišit v závislosti na druhu rostlinného pletiva, ale také během vegetace může docházet ke změnám v jejich obsahu (Fuchs, 1982; Stewart a Nassuth, 2001). Ale vše, co snižuje spolehlivost metody RT-PCR, by s velkou pravděpodobností mělo ovlivňovat i metodu qRT-PCR, která je však dle získaných výsledků očividně spolehlivější. To však může být vysvětleno vyšší citlivostí metody qRT-PCR (Mumford *et al.*, 2000; Weller *et al.*, 2000; Boonham *et al.*, 2002, 2004; Korimbocus *et al.*, 2002).

Co se týče rozdílnosti v detekovatelnosti virů mezi metodami DAS/I-ELISA a RT-PCR, jsou pozorované nuance ve shodě s již dříve publikovanými studiemi: sérologické testy jsou využitelné po kratší dobu vegetace než RT-PCR, optimálních výsledků dosahují jen s mladými listy a květy a

jsou méně citlivé než RT-PCR (Torrance a Dolby, 1984; Kinard *et al.*, 1996; Desvignes, 1999; Kirby *et al.*, 2001). Dle výsledků uvedených v předkládané práci představuje výjimku detekce ACLSV, kdy bylo možné tento virus detekovat v jarním období pouze metodou DAS-ELISA, zatímco metoda RT-PCR přítomnost patogena v rostlinném pletivu neodhalila. Vysvětlením by mohlo být, že došlo k ovlivnění RT-PCR reakce inhibitory, které nemusí být v případě sérologických a molekulárních metod shodné.

Ma *et al.* (2008) uvádí, že v rostlinném pletivu jsou přítomné různé chemické sloučeniny, které mohou působit jako inhibitory a tak mohou blokovat amplifikaci v průběhu PCR. V jabloních byl prokázán vysoký obsah polysacharidů a fenolických sloučenin (Schmitz a Noga, 2000), které mohou blokovat reverzní transkriptázu případně polymerázu při RT-PCR, pokud se je nepodaří odstranit během izolace RNA (Demeke a Adams, 1992; Staub *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1996; Menzel *et al.*, 2002). Ale také v případě sérologických testů (ELISA) může vysoký obsah polyfenolů a polysacharidů v dřevinách ovlivnit spolehlivost těchto testů (Mitra a Kootstra, 1993). Zmiňované metody se mohou navzájem lišit i v citlivosti k jednotlivým inhibitorům obsaženým v rostlinách, což by mohlo vysvětlit rozdíly v jejich spolehlivosti v průběhu vegetace a i v různých rostlinných pletivech. Při sérologických testech jsou využívány různé druhy protilátek od více výrobců, které se mohou také navzájem lišit v citlivosti na zmiňované blokanty a pravděpodobně i enzymy používané v RT-PCR testech mohou mít rozdílnou citlivost k obsaženým nečistotám.

Důvodem různé spolehlivosti detekčních testů by však také mohl být rozdílný obsah virové RNA detekované metodou RT-PCR a syntetizovaného virového proteinu, který je detekován sérologickou metodou ELISA. Replikace viru a syntéza proteinů nemusí v průběhu vegetace, případně v různých rostlinných tkáních, probíhat rovnoměrně a na stejné úrovni.

Řada autorů také uvádí, že na používané detekční testy může mít vliv, že jednotlivé rostlinné orgány a pletiva se liší v obsahu virů (Kryczynski *et al.*, 1995; Menzel *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2008). Také Fuchs *et al.* (1985) popisuje, že k fluktuaci virů z rodů *Ilarvirus* a *Trichovirus* dochází a během léta se snižuje obsah virů následkem vysokých teplot. Je však důležité upozornit na fakt, že tyto závěry byly učiněny pouze na základě relativní kvantifikace virů pomocí sérologických případně RT-PCR metod. I v této práci při relativní kvantifikaci pomocí DAS/I-ELISA a RT-PCR testů docházelo k fluktuaci koncentrace virů v průběhu vegetace, případně mezi různými rostlinnými materiály. Avšak naše výsledky z absolutní kvantifikace virů pomocí qRT-PCR naznačují, že k výrazným změnám

v koncentraci studovaných virů v průběhu vegetace ani mezi různými rostlinnými materiály nedochází. Je nepravděpodobné, že drobné změny v koncentraci by samy o sobě mohly mít tak výrazný vliv na spolehlivost detekce pomocí zmíněných testů. Výjimku zřejmě tvoří ApMV, u něhož lze v průběhu vegetace změny v koncentraci pozorovat i při použití qRT-PCR. To sice nemá vliv na spolehlivost detekce touto metodou, ale spolehlivost dalších sledovaných detekčních technik by to ovlivnit mohlo. V případě ACLSV se metodou qRT-PCR potvrdilo, že nejvyšší koncentrace viru je v květech, což naznačovaly i výsledky ze sérologického testu DAS-ELISA. Že by se v květech mohly některé viry objevovat ve vyšších koncentracích, již bylo některými autory zmiňováno a doporučovali je proto k diagnostickým testům virů (Torrance and Dolby, 1984; Kinard *et al.*, 1996; Desvignes, 1999; Kirby *et al.*, 2001).

Na základě našich výsledků jasně vyplývá, že změny v detekovatelnosti patogenů jsou s velkou pravděpodobností ovlivněny více faktory, které na sebe vzájemně působí, a proto je velice složité určit příčinu rozdílné spolehlivosti testovaných metod, což ve své studii uvádějí i Mackenzie *et al.* (1997). Při detekci a kvantifikaci virů pomocí molekulárních metod hraje významnou roli i samotná izolace nukleových kyselin. Právě v případě dřevin, tedy i ovocných stromů, je získání vysoce kvalitních nukleových kyselin bez, nebo jen s minimálním množstvím přítomných inhibitorů PCR reakce zcela zásadní (Korschineck *et al.*, 1991). V rámci této práce byly využívány dvě izolační techniky, izolace kitem *SpectrumTM Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich Co.) a izolace celkové RNA „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001). V případě izolace z jabloní byly obě tyto metody vhodné a poskytovaly RNA v dostačující kvalitě a čistotě, ale izolace kitem měla vyšší výtěžnost RNA. Její nevýhodou je však vyšší cena, a pokud by měl být tento typ izolace použit pro další hostitelské rostliny, bylo by nutné jeho spolehlivost vyzkoušet. Při izolaci kitem jsou využívány speciální kolony, jež se mohou u některých rostlin zanést, díky většímu obsahu polyfenolů a polysacharidů. Izolace „silika“ metodou, která je v naší laboratoři běžně používána, je naopak, na základě našich dlouholetých zkušeností, aplikovatelná na široké spektrum hostitelů (jabloně, hrušně, jeřáby, rod *Prunus* atd.).

Důležitým faktorem při diagnostice virů je také správné a pečlivé provedení popsaných postupů, což lze potvrdit řadou kontrolních mechanismů (spektrofotometrické stanovení

koncentrace a čistoty RNA, stanovení integrity celkové RNA atp.). Ty by měly být využívány nejen při optimalizaci již zavedených metod do nových laboratoří nebo při jejich aplikaci na nové patogeny, jak je doporučováno v certifikovaných metodikách (Sedlák *et al.*, 2014; Winkowska *et al.*, unpublished [a]), ale také při zavedeném rutinním testování vzorků. V těchto případech by se však jednalo o náhodné kontroly omezeného počtu testovaných vzorků.

Infekce u studovaných virů je většinou bezpříznaková (Neméth, 1986), a proto je při monitoringu jejich výskytu nutné využívat sérologické případně molekulární metody (Waller *et al.*, 2002). I v případě monitoringu provedeného v rámci této práce byla většina testovaných stromů bezpříznakových nebo byly přítomny jen velice mírné příznaky, které neumožňovaly s jistotou potvrdit virovou infekci na daném stromě. Z tohoto důvodu bylo testování přítomnosti virových patogenů na stromech provedeno pomocí molekulárních metod RT-PCR, případně qRT-PCR, které mají vyšší citlivost a spolehlivost.

Přestože byl monitoring na jabloních proveden na relativně malém území, i když v době výsadby stromů (před 60-80 lety) se nejednalo o tak silně zalidněné a propojené území, lze ho považovat za významný a to nejen s ohledem na různé stáří stromů, ze kterých byly vzorky odebírány, ale také s ohledem na různý původ stromů, protože se jednalo o kulturně pěstované i volně rostoucí jabloně.

Testováním výsadbám jabloní ze starých kulturních sadů nebyla v minulosti věnována skoro žádná údržba ani péče. Netestovaly se na přítomnost virových patogenů, není tedy znám jejich zdravotní stav, avšak v současnosti často dochází k jejich revitalizaci, a proto pro nás bylo zajímavé potvrdit přítomnost virových infekcí a míru jejich rozšíření. Studované viry se šíří na jabloních pravděpodobně pouze vegetativně, a jelikož testované jabloňové sady nebyly udržovány, jak už bylo zmíněno, tak se tam případné přítomné viry rozšířily pravděpodobně už v době výsadby stromů.

Na základě výsledků monitoringu se ukázalo, že ve starých kulturních výsadbách jabloní jsou ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV velice rozšířeny (sady, zahrady). I v předchozích studiích výskytu významných virů jabloní na našem území, se u kulturně pěstovaných jádovin (ovocné sady), potvrdil jejich značný výskyt (Kundu, 2003b; Kundu *et al.*, 2003; Polák a Svoboda, 2006; Polák a Zieglerová, 2001; Polák *et al.*, 1997; Svoboda a Polák, 2010). U volně rostoucích jabloní nebyl zatím u nás a pravděpodobně ani jinde podobný monitoring

proveden. Přítomnost širokého spektra virů byla pozorována u volně rostoucích peckovin, ale do této studie nebyla zahrnuta detekce ASGV a ASPV. Výskyt ApMV a ACLSV byl však v rámci tohoto monitoringu potvrzen u velmi malého množství vzorků, jednalo se o infekci několika stromů z přibližně 300 testovaných (Polák, 2007). Také v námi dříve provedené studii na planých volně rostoucích peckovinách nebyla infekce ApMV a ACLSV potvrzena (Winkowska *et al.*, unpublished [b]). U planých volně rostoucích stromů testovaných na přítomnost virů v této práci byla zaznamenána infekce ojediněle, ApMV bylo detekováno na jednom, ASGV na třech a ASPV na čtyřech stromech. Přítomnost ACLSV se nepodařilo prokázat na žádném z testovaných volně rostoucích stromů. Tyto výsledky ukazují, že významným faktorem při šíření virů na jabloních je člověk, který stromy vegetativně množí. V případě ASGV, ASPV a ACLSV zatím nebyl u jabloní popsán jiný způsob přenosu virů než vegetativní cestou (Neméth, 1986; Fulton, 1952).

Velmi zajímavým byl pro nás výskyt ApMV, ASGV a ASPV na několika volně rostoucích stromech, jak už bylo zmíněno výše. Tato skutečnost naznačuje, že přenos vegetativním množením není jediným způsobem, jak se studované viry mohou šířit. V případě ApMV není stále potvrzeno, zda se může virus přenášet semenem nebo pylem. Na lískách a jírovcích byly prováděny studie zabývající se možností přenosu semenem i pylem, ale jednoznačně se tento způsob přenosu potvrdit nepodařilo (Aramburu a Rovira, 2000; Cameron a Thompson, 1986; Postman a Mehlenbacher, 1994; Sweet a Barbara, 1979). Další možností jak mohly být stromy infikovány, je i srůst kořenů s poblíž rostoucím stromem, který by mohl být zdrojem infekce. Tento způsob šíření byl popsán u ApMV v ovocných i okrasných školkách (Hunter *et al.*, 1958, Dhingra, 1972) a pravděpodobně jsou tímto způsobem infikovány i plevelné rostliny v sadech (Arli-Sokmen *et al.*, 2005). Na stanovištích, kde se infikované stromy nacházejí, se však žádný další jabloňový strom nenacházel. Získané výsledky zároveň naznačují, že ACLSV se šíří pouze vegetativním rozmnožováním a existence vektora nebo jiného způsobu přenosu viru je zde nepravděpodobná. Tento virus nebyl nalezen na žádném z volně rostoucích stromů zato v sadech a zahradách se jednalo o nejrozšířenější virus. Už Polák *et al.* (1997) uvádí, že ACLSV není zřejmě přenášen žádným vektorem, protože u ozdravených stromů se reinfekce v podstatě neobjevuje.

Většina testovaných jabloní nevykazovala žádné příznaky virové infekce, což by mohlo naznačovat určitou toleranci starých odrůd k virové infekci. Již dříve byly provedeny studie

na starých odrůdách jabloní na možnou toleranci případně rezistenci k bakteriálním a houbovým chorobám a v některých případech byly tyto hypotézy i potvrzeny. Týká se to například spály růžokvětých, padlí jabloňového a strupovitosti jabloní (Kása *et al.*, 2005; Tóth *et al.*, 2005 a, b; Bálint *et al.*, 2013). I z tohoto důvodu byl monitoring zaměřen na starší výsadbu jabloní. Z výsledků však vyplývá, že výskyt virů u starých jabloňových odrůd je značný. Dobře to lze demonstrovat na jabloňové školce z jižní Moravy, kde bylo otestováno velké množství kultivarů a pouze u jednoho (Jadernička moravská) nebyl nalezen žádný ze sledovaných virů. Ale jelikož byl testován pouze jeden strom tohoto kultivaru, není možné potvrdit rezistenci této odrůdy. Bylo by nutné provést další testy potvrzující její případnou rezistenci.

Při monitoringu se nepodařilo zachytit žádný výskyt zmiňovaných virů na méně obvyklých hostitelích či dosud netestovaných druzích. Jednou z možných příčin je omezená velikost lokality, kde byla tato pozorování prováděna, ale i relativně omezený počet vzorků (přibližně 100) vzhledem k pravděpodobně mnohem ojedinělejšímu výskytu virů na těchto hostitelských rostlinách. Význam by mohla mít i předpokládaná nižší koncentrace sledovaných virů v těchto méně známých hostitelských rostlinách (Desvignes *et al.*, 1999). U ASPV a ASGV je nezanedbatelné i to, že zatím bylo potvrzeno jen úzké spektrum hostitelských rostlin (Neméth, 1986; Yoshikawa, 2000).

U ApMV se v rámci analýzy nukleotidů genu pro CP neukázaly výraznější rozdíly mezi našimi izoláty, a to i přes jejich různý původ, jak z volně rostoucích, tak kulturních výsadeb. Velkou sekvenční identitu vykazovaly české izoláty z jabloní i se 4 vybranými izoláty z jabloní ze zahraničí. Tyto výsledky naznačují, že geografický původ nemá vliv na variabilitu genu pro CP. Tyto výsledky jsou v souladu s již dříve uveřejněnými studiemi, které uvádějí, že pravděpodobněji se budou izoláty lišit na různých hostitelských rostlinách (Grimová *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2002; Thokchom *et al.*, 2009).

Také u ASGV byla molekulární variabilita českých izolátů velice nízká. Zároveň tyto izoláty vykazovaly velkou podobnost s indickými izoláty z jabloní, ale od čínských izolátů, se obě skupiny izolátů odlišovaly více. V dříve provedené studii, měly indické izoláty výraznou shodu s italskými a ukrajinskými izoláty (98 - 99 %) a také zde se odlišoval čínský izolát z jabloně. Do studie však byly zahrnuty i izoláty z hrušní různého geografického původu a

výraznější rozdíly se projevily spíše na základě hostitelské rostliny izolátu než v případě geografického původu (Ferreti *et al.*, 2010). V práci Gadiou *et al.* (2010) byly porovnávány sekvence několika izolátů ASGV z jabloní pocházející z Indie, České republiky, Srbska a Turecka a byla mezi nimi vysoká sekvenční identita (90,6 – 91,8 %). Z těchto výsledků, a i na základě naší studie, lze vyvodit, že je nepravděpodobné, že geografický původ izolátů hraje v rámci variability nukleotidů genu pro CP významnou roli.

V případě ASPV byla molekulární variabilita parciální části genu pro CP mezi izoláty vyšší ve srovnání se dvěma předchozími viry. Jelikož se však jednalo jen o část genu obalového proteinu, která může být variabilnější, tak je možné, že při porovnání celého genu pro CP by rozdíly nebyly tak výrazné. Ani v případě ASPV však nebylo možné určit, že by na rozdílnost izolátů měl vliv jejich různý geografický původ nebo v případě českých izolátů zda jsou z volně rostoucích nebo kulturně pěstovaných jabloní. Ale i v dřívějších studiích zabývajících se molekulární variabilitou ASPV na úrovni CP, nabývala sekvenční identita širšího spektra hodnot. Ve studii porovnávající izoláty z jabloní a hrušní z Polska byla sekvenční identita mezi 71 – 99 % (Komorowska *et al.*, 2011). V práci Ferretiho *et al.* (2010) byly srovnávány izoláty ASPV z hrušní a jabloní různého geografického původu a shoda se mezi izoláty pohybovala mezi 80 - 94 %. Pravděpodobně je to způsobeno vyšší variabilitou CP tohoto viru, která byla popsána i u některých dalších členů čeledi *Betaflexiviridae* (Alabi *et al.*, 2010; Teycheney *et al.*, 2005).

Také u ACLSV byla pozorována výraznější variabilita nukleotidů pro parciální část genu CP, ale i tento virus patří do čeledi *Betaflexiviridae*. Nebyla však nalezena souvislost mezi geografickým původem izolátů, případně u českých izolátů mezi typem výsadby. Také v předchozí studii variability MP a CP u izolátů z jabloní ze Srbska, Turecka, Ukrajiny, České republiky, Polska a Belgie byla sekvenční identita izolátů 83,5 až 85 % a také nebyla prokázána souvislost s geografickým původem izolátů (Gadiou *et al.*, 2010). V rozsáhlé práci Rana *et al.* (2010), byly porovnávány izoláty ACLSV z mnoha hostitelských rostlin (jabloně, broskvoně, mandloně, slivoně atd.) pocházející z různých geografických oblastí. Sekvenční identita odvozených aminokyselin studovaných izolátů nabývala hodnot 87 až 100 %, ale ani v této studii se nepodařilo prokázat vztah mezi geografickým původem případně hostitelskou rostlinou při rozdělení izolátů.

7. Závěr

V rámci disertační práce se podařilo optimalizovat metodu qRT-PCR pro spolehlivou detekci a kvantifikaci čtyř významných virů, jmenovitě ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV, na jabloních. V průběhu roku byla spolehlivost techniky qRT-PCR pro detekci uvedených virů porovnávána s běžně užívanými detekčními metodami (DAS/I-ELISA a RT-PCR), a to při využití různého rostlinného materiálu (lýko, pupeny, listy a květy). Ukázalo se, že metoda qRT-PCR je pro detekci studovaných virů nejspolehlivější, bylo možné ji použít celoročně a se všemi uvedenými rostlinnými materiály.

Kvantifikace ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV byla provedena také všemi třemi metodami. Avšak u qRT-PCR se jednalo o absolutní kvantifikaci, zatímco metodami DAS/I-ELISA a RT-PCR byla provedena relativní kvantifikace pomocí ředících řad. Při relativní kvantifikaci oběma metodami bylo u všech virů možné pozorovat změny v koncentraci v průběhu roku a i v závislosti na použitém rostlinném materiálu. Metodou qRT-PCR se u ASGV, ASPV a ACLSV nepotvrdilo, že by v průběhu roku docházelo ke změnám v koncentraci virů v rostlinách. U ApMV byly zaznamenány mírné změny v obsahu viru v průběhu roku metodou qRT-PCR. Je proto pravděpodobné, že pouze koncentrace ApMV není v průběhu roku v rostlinách stálá a mohla by tedy ovlivňovat spolehlivost detekčních metod. Rozdíly v koncentraci virů v různém rostlinném materiálu byly metodou qRT-PCR zaznamenány pouze u ACLSV, kde byl vyšší obsah viru v květech.

V rámci monitoringu se podařilo ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV detekovat pouze ve vzorcích z jabloní. Viry byly rozšířeny především v kulturních výsadbách jabloní (v sadech a zahradách) a to bez ohledu na stáří výsadby. U volně rostoucích stromů bylo rozšíření virů prokazatelně nižší. Tyto výsledky naznačují, že velký vliv na šíření virů má člověk při zakládání a údržbě výsadby.

Při studiu molekulární variability izolátů studovaných virů z jabloní se neukázaly výraznější rozdíly mezi námi nově oskenovanými izoláty a staršími izoláty uvedenými v databázi NCBI. V případě izolátů ApMV a ASGV lze rozdíly považovat za minimální a nebyl u nich pozorován ani žádný vztah ke geografickému původu vzorků nebo typu výsadby jabloní (volně rostoucí x kulturní). U ASPV a ACLSV byla různorodost izolátů vyšší, ale to pravděpodobně souvisí s vyšší variabilitou genu CP těchto virů, protože ani v případě izolátů

těchto dvou virů nelze nalézt nějaký vztah mezi geografickým původem izolátů či případně typem výsadby jabloní.

8. Literatura

- 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-Kuhn-Archiv 427. 253-256 p.
- Akbas, B., Degirmenci, K. 2009. Incidence and natural spread of *Apple mosaic virus* on hazelnut in the west black sea coast of Turkey and its effect on yield. *Journal of Plant Pathology* 91. 767–771 p.
- Akbas, B., Degirmenci, K. 2010. Simultaneous detection of *Apple mosaic virus* in cultivated hazelnuts by one-tube RT-PCR. *African Journal of Biotechnology* 9. 1753-1757 p.
- Akbas, B., Ilhan, D. 2005. Widespread Distribution of *Apple mosaic virus* on Apple in Turkey. *Plant Diseases* 89. 1010 p.
- Akbas, B., Ilhan, D., Atlamaz, A. 2004. A preliminary survey for hazelnut (*Corylus avellana* L.) viruses in Turkey. 6th International congress on hazelnut, Tarragona, 2004. 94 p.
- Alabi, O.J., Martin, R.R., Naidu, R.A., 2010. Sequence diversity, population genetics and potential recombination events in grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Pacific North-West vineyards. *Journal of General Virology* 91. 265-276 p.
- Al-Jebr, K., Ismaeil, F., Mando, M. J., Al-Saadoun, E., Al-Chaabi, S. 2005. First record of pome fruit viruses in Syria. *Journal of Plant Pathology* 87. 243 p.
- 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 p.
- Alrefai, R. H., Shiel, P. J., Domier, L. L., D'Arcy, C. J., Berger, P. H., Korban, S. S. 1994. The nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* coat protein gene has no similarity with other *Bromoviridae* coat protein genes. *Journal of General Virology* 75. 2847–2850 p.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25. 3389-3402 p.
- Anonym 1. 2003. Crop Protection Compendium. 2003. CAB International 2003; Wallingford, Oxon, UK.
- Anonym 2. 1991. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1991. Certification schemes Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. *EPPO Bulletin* 2. 267–277 p.
- Anonym 3. 1999. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1999. Certification schemes – pathogen-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia. *EPPO Bulletin* 29. 239-252 p.
- Anonym 4. 2000. European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2000. Schemes for production of healthy plant for planting. Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. PM 4/30 (1). Dostupné také z: <www.eppo.org/standard.html>
- Anonym 5. 2014. International Committee on Taxonomy of Viruses [online - 2014]. Dostupné z: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>
- Ansel-McKinney, P., Gehrke, L. 1998. RNA determinants of a specific RNA-coat protein peptide interaction in *Alfalfa mosaic virus*: conservation of a homologous features in *Ilarvirus* RNAs. *Journal of Molecular Biology* 278. 767-785 p.
- Aramburu, J. M., Rovira, M. 2000. Incidence and natural spread of *Apple mosaic ilarvirus* in hazel in north-east Spain. *Plant Pathology* 49. 423-427 p.
- Arli-Sokmen M.A., Yilmaz, N.D.K., Mennan, H. , Sevik, M.A. 2005. Natural weed hosts of *Apple mosaic virus* in hazelnut orchards in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 87. 239 – 242 p.
- Arntjen A., Jelkmann, W. 2010. Investigation of virus occurrence in different tissues throughout the year and sequence variability of *Apple stem pitting virus*. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kuhn Archiv 427.
- Bálint J., Thiesz R., Nyárádi I.I., Szabó K. A. 2013. Field evaluation of traditional apple cultivars to induced diseases and pests. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanoco* 41. 238-243 p.
- Barba, M., Clark, M. F. 1986. Detection of strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* by F(ab)₂-based indirect ELISA. *Acta Horticulture* 193. 297-304 p.
- Barba, M., Martino, L., Lauretti, F. 1992. Comparison of different methods to produce virus free stone fruits. *Acta Horticulture* 193. 385-392 p.

- Barbara, D. J., Clark, M. F., Thresh, J. M., Casper, R. 1978. Rapid detection and serotyping of *Prunus necrotic ringspot virus* in perennial crop by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology* 90. 395-399 p.
- Betti, J. A., Del Castro, J. L., Muller, G. W. 1995. Detecção de viroses da macieira em São Paulo com doze indicadoras lenhosas. *Summa Phytopathologica* 21. 49 p.
- Bhardwaj, S. V., Rai, S. J., Thakur, P. D., Handa, A. 1998. Meristem tip culture and heat therapy for production of *Apple mosaic virus* free plants in India. *Acta Horticulture* 472. 135-140 p.
- Bol, J. F. 1999. *Alfalfa mosaic virus* and *Ilarviruses*: involvement of coat protein in multiple steps of the replication cycle. *Journal of General Virology* 80. 1089–1102 p.
- Boonham N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Benison, J., Barker, I. 2002. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips vectors using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 101. 37-48 p.
- Boonham N., González-Pérez, L., Mendez, M.S., Peralta, E.L., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I., Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid*. *Journal of Virological Methods* 116. 139-146 p.
- Bradford, F. C., Joly, L. 1933. Infectious variegation in the apple. *Journal of agricultural research* 46. 901–908 p.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., Zurcher, E. J. 1996. Plant viruses online: Descriptions and lists from VIDE Database. Dostupné z: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>.
- Buck, K. W. 1997. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in Virus Research* 47. 159–251 p.
- Caglayan K., Ulubas Serce, 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 p.
- Cameron, H. R. 1989. Pear vein yellows. In: *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. Ed: Fridlund, P. R. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, Pullman. 175-181 p.
- Cameron H. R., Thompson M. 1986. Seed transmission of *Apple mosaic virus* in hazelnut. *Acta Horticulturae* 193. 131-132 p.
- Campbell, A.I., 1963. The effect of some latent virus infections on the growth and cropping of 327 apples. *Journal of Horticulture Sciences* 38, 15-19.
- Campbell, A. I. 1968. Heat sensitivity of some apple viruses. *Tagungsber. DAL DDR Berlin* 97. 311-316 p.
- Candresse, T., Lanneau, M., Revers, M., Grasseau, N., Macquaire, G., German, S., Malinowski, S., Dunez, J. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *Apple chlorotic leafspot virus*. *Acta Horticulture* 386. 136-147 p.
- Candresse, T., German, S., Lanneau, M., Dunez, J. 1996. In vitro translation of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) RNA. *Archives of Virology* 141. 2031-2043 p.
- Candresse, T., Kofalvi, S., Lanneau, M., Dunez, J. 1998. A PCR-ELISA procedure for simultaneous detection and identification of *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV) and *Apple mosaic* (ApMV) *ilarviruses*. *Acta Horticulture* 472. 219-226 p.
- Canova, A. 1960. La virosi delle piante da frutto. Edizioni Agricole Bologna, Italy. 52–55 p.
- Cieslinska, M., Malinowski, T., Zawadzka, B. J. 1995. Studies on several strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulture* 386. 63-71 p.
- Cieslinska, M. 2002. Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulture* 596. 481-484 p.
- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the plant viruses. *Journal of General Virology* 34. 475-483 p.
- Clover, G. R. G., Pearson, M., N., Elliot, D. R., Tang, Z., Smales, T. E., Alexander, B. J. R. 2003. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology* 52. 371-378 p.
- Cropley, R., Wolfswinkel, L. D., Posnette, A. F. 1963. The identification of some viruses infecting apple, pear and quince. *Phytopathologica Mediterranea* 2. 132-136 p.
- Cropley, R., Posnette, A.F. 1973. The effect of viruses on growth and cropping of pear trees. *Annals of Applied Biology* 73. 39-43 p.
- Crossley, S. J., Jacobi, V., Adams, A. N. 1998. IC-PCR amplification of *Apple stem grooving virus* isolates and comparison of polymerase and coat protein gene sequences. *Acta Horticulture* 272. 113-118 p.
- Demeke T., R.P. Adams, 1992. The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12, 332-334

- Delbos, R. P., Dunez, J. 1988. *Apple chlorotic leaf spot virus*. In: European Handbook of Plant Disease. Ed: Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A., Philips, D. H., Archer, S. A. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 5-7 p.
- Deogratias, J. M., Dosba, F., Lutz, A. 1989. Eradication of *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, and *Apple chlorotic leaf spot virus* in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and in vitro culture. Canadian Journal of Plant Pathology 11. 337-342 p.
- De Sequeira, O. A. 1967. Purification and serology of an *Apple mosaic virus*. Virology 31. 314-322 p.
- De Sequeira, A. O., Posnette, A. F. 1969. *Apple stem grooving virus*. In: Virus Diseases of Apples and Pears. Commonw Bur. Horticulture Plant Crops Technique Communication 30 (2/3/4). 76a-76d p.
- Desvignes, J. C. 1971. Observations on some pear virus diseases: vein yellows, quince sooty ringspot, ring pattern mosaic. Annals of Phytopathology. 295-304 p.
- Desvignes, J. C. 1976. The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedlings GF 305 indicator. Acta Horticulture 67. 315-323 p.
- Desvignes, J. C., Boye, R. 1988. Different diseases caused by the *Chlorotic leaf spot virus* on the fruit trees. Acta Horticulture 235. 31-38 p.
- Desvignes, J. C. 1999. Maladies a virus de arbes fruitiers. CTIFL.
- Desvignes, J. C., Boyé, R., Cornaggia, D., Grasseau, N. 1999. Virus diseases of fruit trees. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris.
- Detienne, G., Delbos, R., Dunez, J. 1980. Use and versatility of the immunoenzymatic ELISA procedure in the detection of different strains of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Acta Phytopathologica Academia Scientifica Hungaria 15. 39-45 p.
- Dhingra, K. L. 1972. Transmission of *Apple mosaic virus* by natural root grafting. Indian Journal of Horticulture 29. 348-350 p.
- Diekmann, M., Putter, C. A. J. 1996. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm No. 16 Stone Fruit. Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Di Terlizzi B., Savino, V., Digiario, M., Murolo, O. 1992. Viruses of peach, plum and apricot in Apulia. Acta Horticulturae 309. 93-98 p.
- Di Terlizzi, B. 1998. Sanitary status of stone fruit industry in the Mediterranean countries: Italy. In: Stone Fruit Viruses and Certification in the Mediterranean Countries: Problems and Prospects. Ed: Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. Options Mediterranean Serie B, 19, Ciheam. 53-56 p.
- Dominguez S., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Pallás, V., Cano, A., Garcia-Brunton, J. 1998. Studies on the incidence of ilarviruses and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in apricot trees in the Murcia region (Spain) using serological and molecular hybridization methods. Acta Horticulturae 472. 203-210 p.
- Duan, H., Ji, Z., Wang, S., Hu, T., Wang, Y., Cao, K. 2013. Molecular Characterization and Distribution of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* on Apple in China. Journal of Phytopatology 162. 284-290 p.
- Dursunoglu S., Ertunc, F. 2008. Distribution of *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV) in Turkey. Acta Horticulturae 781. 131-134 p.
- Elibüyük İ.Ö., Erdiller, G. 1998. Studies on the identification of viruses in stone fruit trees growing in Malatya province. In: Proceedings, 8th Turkish Phytopathology Congress, Ankara, Turkey. 89-94 p.
- Ellenberger, E. C. 1962. Dual infection test with three viruses causing leaf symptoms in plum. Journal of Horticulture Sciences 37. 285-290 p.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution vol. 39.783-791p.
- Ferretti, L., Hallan, V., Rana, T., Ram, R., Dhir, S., Negi, A., Lakshmi, V., Thockchom, T., Zaidi, A.A., Barba, M. 2010. Nucleotide analysis of pome fruit virus isolates detected in apple and pear samples from Italy and India. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius Kuhn Archiv 427. 230-236 p.
- Flegg, C. L., Clark, M. F. 1979. The detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* by a modified procedure method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Annals of Applied Biology 91. 61-65 p.
- Fridlund, P. R. 1980. Glasshouse indexing for fruit tree viruses. Acta Phytopathologica Academia Scientifica Hungaria 15. 153-158 p.
- Fuchs E., 1982. Studies of the development of concentration of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) in apple trees. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae 17. 23-27p.

- Fuchs E., Gruntzig, M., Merker, D. 1985. Serologischer vergleich verschiedener isolate des Stammfurchungsvirus des apfels (*Apple stem grooving virus*) und des Chlorotischen 352 blattfleckungs-virus des apfels (*Apple chlorotic leaf spot virus*). Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 21. 427-435 p.
- Fuchs, E., Gruntzig, M., Al Kai, B. 1988. Der serologische Nachweis mechanisch ubetragbarer Viren des Kern- und Steinobstes. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 10. 208-211 p.
- Fulton, R. W. 1952. Mechanical transmission and properties of *Rose mosaic virus*. Phytopathology 42. 413-416 p.
- Fulton R. W. 1967. Purification and serology of *Rose mosaic virus*. Phytopathology 57. 1197-1201 p.
- Fulton, R. W. 1972. *Apple mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83, UK.
- 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 p.
- Gent, D. H. 2013. Diseases of Hop: Identification and Management. Dostupné z: <http://www.msue.msu.edu/objects/content_revision/download.cfm/revision_id.552828/workspace_id.27753/>
- 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 p.
- German, S., Candresse, T., Le Gall, O., Lanneau, M., Dunez, J. 1992. Analysis of the dsRNA of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Journal of Virology 73. 767-773 p.
- German, 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 Virology 142. 833-841 p.
- Gilles, G. L., Bormans, H. L. 1989. Improvement of greenhouse and field indexing techniques for fruit tree viruses. Acta Horticulture 235. 159-168 p.
- Giunchedi, L. 2003. Malattie da Virus, Viroidi e Fitoplasmidi degli alberi di frutto. Edizione Agricole, Bologna, Italy.
- Gotlieb, A. R., Berbee, J. G. 1973. Line pattern of birch caused by *Apple mosaic virus*. Phytopathology 63. 1470-1477 p.
- Grimová, L., Winkowska, L., Ryšánek, P., Svoboda, P., Petrzik, K. 2013. Reflects the coat protein variability of *Apple mosaic virus* host preference? Virus Genes 47. 119-125 p.
- Gruntzig, M., Fuchs, E., Hentsch, T. 1996. Occurrence and serological detection of *Cherry leaf roll nepovirus* (CLRV) and *Apple mosaic ilarvirus* (ApMV) in *Betula* spp. Journal of Plant Diseases and Protection 103. 571-581 p.
- Gugerli, P., Ramel, M. 2004. Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of *Apple stem pitting* and *pear yellow vein viruses* in apple and pear. Acta Horticulture 657. 59-69 p.
- Hadidi A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. 2011. Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone fruits. St. Paul, Minnesota U.S.A., American Phytopathological Society Press. 428 p.
- Hansen, A. J., Lane, W. D. 1985. Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* from apple shoot cultures by ribavirin. Plant Diseases 69. 134-135 p.
- Hassan, M., Myrta, A., Polak, J. 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virology Methods 133. 124-129 p.
- Herranz, M. C., Sánchez-Navarro, J. A., Aparicio, F., Pallás, V. 2005. Simultaneous detection of six stone fruit viruses by non-isotopic molecular hybridization using a unique riboprobe or polyprobe. Journal of Virology Methods 124. 49-55 p.
- Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M., Namba, S. 2003. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes symptom attenuation. Journal of General Virology 84. 2579-2583 p.
- Howell, W. E., Mink, G. I., Hurtt, S. S., Foster, J. A., Postman, J. D. 1996. Select *Malus* clones for rapid detection of *Apple stem grooving virus*. Plant Diseases 80. 1200-1202 p.
- Hunter, J. A., Chamberlain, E. E., Atkinson, J. D. 1958. Note on the transmission of *Apple mosaic virus* by natural root grafting. New Zealand Journal of Agricultural Research 1. 80 - 82 p.
- Hunter, J. A., Chamberlain, E. E., Atkinson, J. D. 1959. Note on a modification in technique for inactivating *Apple mosaic virus* in apple wood by heat treatment. New Zealand Journal of Agricultural Research 2. 45-46 p.

- İlbağ, H., Citir, A., Bostan, H. 2008. *Prunus spinosa* L. – A natural wild host of some important fruit viruses in Tekirdag, Turkey. *Acta Horticulture* 781. 33-36 p.
- Inouye, N., Maeda, T., Mitsuhashi, K. 1979. *Citrus tatter leaf virus* isolated from Lily. *Annals of Phytopathologica Society Japonica* 42. 712-720 p.
- İsmail, F., Al-Jabor, K., Myrta, A., Mando, M. J., Al-Saadoun, E., Hassan, M., Al-Chaabı, S. 2006. Viruses of pome fruit trees in Syria. *EPP0 Bulletin* 36. 65-68 p.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from Citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods* 106. 235-239 p.
- James, D., Trytten, P. A., Mackenzie, D. J., Towers, G. H. N., French, C. J. 1997. Elimination of *Apple stem grooving virus* by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. *Annals of Applied Biology* 131. 459-470 p.
- James, D. 1998. Factor affecting the detection of *Apple stem grooving virus* by PCR analysis. *Acta Horticulture* 472. 119-124 p.
- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *Apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *Journal of Virology Methods* 83. 1-9 p.
- James, D., Jelkmann, W., Upton, C. 1999. Specific detection of *Cherry mottle leaf virus* using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR. *Plant Diseases* 83. 235-239 p.
- Jarošová, J., Kundu, J. K. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biology* 10. 146 p.
- Jaspars, E. M. J. 1985. Interaction of *Alfalfa mosaic virus* nucleic acid and protein. *Molecular Plant Virology*. Boca Raton: CRC Press. 155-221 p.
- Jelkmann, W., Kunze, L., Vetten, H. J. Lesemann, D. E. 1992. CDNA cloning of DSRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for relationship of the virus-like agents associated with *Apple stem pitting* and *Pear vein yellows*. *Acta Horticulture* 309. 55-62 p.
- Jelkmann, W. 1994. Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with *potex*- and *carlaviruses*. *Journal of General Virology* 75. 1535-1542 p.
- Jelkmann, W., Kunze, L. 1995. Plum pseudopox in german prune after infection with an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* causing plum line pattern. *Acta Horticulture* 386. 122-125 p.
- Jelkmann, W., Keim-Konrad, R. 1997. An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Phytopathology* 145. 499-504 p.
- Jelkmann, W. 2001. Detection of viruses and virus-like disease of fruit trees-laboratory assays, bioassays and indicators. *Acta Horticulture* 550. 473-491 p.
- Jelkmann, W. 2004. Detection of viruses and virus-like diseases of fruit trees. *Acta Horticulture* 657. 575-595 p.
- Jelkmann, W., Paunovic, S. 2011. *Apple stem pitting virus* in Pome Fruits. 8th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 35-40 p.
- Kása K., Hevesi M., Tóth M. 2005. Evaluation of traditional Hungarian cultivars as source of resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 663 (1): 225-228.
- Karešová, R., Paprstein, F. 2001. *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulture* 550. 259-264 p.
- 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 p.
- Kerlan, C., Mille, B., Dunez, J. 1981. Immunosorbent electron microscopy for detection *Apple chlorotic leaf spot* and *Plum pox viruses*. *Phytopathology* 71. 400-404 p.
- Keshavarz, T., Shams-Bakhsh, M., Nourinejad, Z. S. 2009. First report of *Apple chlorotic leaf spot virus* infection of apple trees in Iran. *Journal of Plant Pathology* 91 (1). 231-240 p.
- Kinard, G. R., Scott, S. W., Barnett, O. W. 1996 Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving viruses* using RT-PCR. *Plant Diseases* 80. 616-621 p.
- Kirby, M. J., Guise, C. M., Adams, A. N. 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for *Apple stem grooving virus*. *Journal of Virology Methods* 93. 167-173 p.
- Klein R. E., Husfloen, S.D. 1995. Incidence of five viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 79. 425 p.

- Knapp, E., Camara Machado, A., Pohringer, H., Wang, Q., Hanzer, V., Weiss, H., Weiss, B., Katinger, H., Laimer da Camara Machado, M. 1995. Localization of fruit tree viruses by immunotissue printing in infected shoots of *Malus* sp. And *Prunus* sp. *Journal of Virology Methods* 55. 157-173 p.
- Kobyłko, T., Nowak, B., Urban, A. 2005. Incidence of *Apple mosaic virus* (ApMV) on hazelnut in south-east Poland. *Folia Horticulturae* 17 (2). 153-161 p.
- Koganezawa, H., Yanase, H. 1990. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Diseases* 74. 610-614 p.
- Komorowska, B., Siedlecki, P., Kaczanowski, S., Hasiow-Jaroszewska, B., Malinowski, T. 2011. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of Apple stem pitting virus. *Virus Research* 158. 263-267 p.
- Komorowska B., Malinowski T., Michalczyk L., 2010. Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Virological Methods* 168. 242-247 p.
- Korimbocus J., Coates, D., Barker, I., Boonham, N. 2002. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 103. 109-120 p.
- Korkmaz, G., Sipahioglu, H. M., Usta, M. 2013. Survey of *Apple mosaic virus* in apple-growing provinces of East Anatolia (Malatya and Van) by RNA probe hybridization assay and RT-PCR. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37. 711-718 p.
- Korschineck I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, H., Katinger, H.W.D. 1991. A PCR membrane spot assay for the detection of *Plum pox virus* RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods* 31. 139-146 p.
- Kryczynski S., Szyndel, M.S., Paduch-Cichal, E., Glowacki, M. 1995. Virus-infection status of some apple propagative material plantations in Poland. *Phytopathologica Polonica* 10/22, 75-84.
- Kundu, J. K., Svoboda, J., Polák, J. 2003. Detection of *Apple stem grooving virus* from different tissues of apple trees throughout the year. *Plant Protection Science* 39. 93-96 p.
- Kundu J.K., 2003(a). A rapid and effective RNA release procedure for virus detection in woody plants by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virologica* 47, 147-51.
- Kundu, J. K. 2003(b). The Occurrence of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Stem Grooving Virus* within Field-Grown Apple Cultivars Evaluated by RT-PCR. *Plant Protection Science* 39 (3). 88-92 p.
- Lakshmi, V., Hallan, V., Ram, R., Ahmed, N., Zaidi, A. A., Varma, A. 2011. Diversity of *Apple mosaic virus* Isolates in India Based on Coat Protein and Movement Protein Genes. *Indian Virological Society*.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.; 2007; Clustal W and Clustal X version 2.0.; *Bioinformatics* vol. 23; 2947-2948p.
- Lee, G. P., Ryu, K. H., Kim, H. R., Kim, C. S., Lee, D. W., Kim, J. S., Park, M. H., Noh, Y. M., Choi, S. H., Han, D. H., Lee, C. H. 2002. Cloning and phylogenetic characterization of coat protein genes of two isolates of *Apple mosaic virus* from 'Fuji' apple. *Journal of Plant Pathology* 18. 259-265 p.
- Lemoine, J., Michelesi, J C. 1995. 15 years of observation on the agronomic behavior of 7 heat-treated pear tree cultivars. *Scientia Horticulture* 60. 279-286 p.
- Lenz, O., Petrzik, K. 2005. Parallel detection of fruit-tree viruses by oligonucleotide microarrays. Meeting COST853, Agriculture Biomarkers for Array-technology, Gdansk, Poland.
- Leone, G., Lindner, J. L., Jongedijk, G., Van Der Meer, F. A. 1995. Back transmission of a virus associated with *Apple stem pitting* and *Pear vein yellows*, from *Nicotiana occidentalis* to apple and pear indicators. *Acta Horticulture* 386. 72-77 p.
- Lister, R. M., Bancroft, J. B., Nadakavukaren, M. J. 1965. Some sap transmissible viruses from apple. *Phytopathology* 55. 859 p.
- Lister, R. M. 1970. *Apple stem grooving virus*. CMI/AAB Description of plant viruses No. 31. Commonwealth Agriculture Bureaux Kew.
- Lister, R. M., Hadiddi, A. 1971. Some properties of *Apple chlorotic leaf spot virus* and their relation to purification problems. *Virology* 45. 240-351 p.
- Lister, R. M., Bar-Joseph, M. 1981. *Closteroviruses*. In: Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, Ed: E. Kurstak. Elsevier/North- Holland, Biomedical Press, Amsterdam. 809 p.
- Lister, R. M. 1996. *Apple stem grooving virus*. In: Viruses of Plants, Ed. Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. Wallingford, U. K. CAB International. 105-108 p.
- Liu, P., Zhang, L., Zhang, H., Jiao, H, Wu, Y. 2013. Detection and Molecular Variability of *Apple Stem Grooving Virus* in Shaanxi, China. *Journal of Phytopathology* 161. 445-449 p.

- Llácer, G., Cambra, M., Lavina, A., Aramburu, J. 1985. Suitable conditions for detecting *Apple chlorotic leaf spot virus* in apricot trees by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Agronomie* 5. 809-812 p.
- Llácer G., Cambra, M., Lavina, A., Aramburu, J. 1986. Viruses infecting stone fruit trees in Spain. *Acta Horticulturae* 193. 95-99 p.
- Lolic, B., Matic, S., Duric, 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-Kuhn-Archiv* 427. 245–247 p.
- Lovisollo, O., Accotto, G. P., Masenga, V., Colariccio, A. 2003. An isolate of *Apple stem grooving virus* associated with Cleopatra mandarin fruit intumescence. *Fitopatologia Brasileira* 28. 54-58 p.
- Luckwill, L. C., Campbell, A. I. 1959. *Malus platycarpa* as an apple virus indicator. *Journal of Horticulture Sciences* 34. 248-252 p.
- Ma B.G., Niu, J.X., Bunker, M.M., Pan, L.Z., Zhang, H.P., Zhang, L.X. 2008. Detection of three pear viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of an internal control. *Australasian Plant Pathology* 37. 117-122 p.
- Mackenzie D.J., Mclean, M.A., Mukerji, S., Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81. 222-226 p.
- Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito T., Miyakawa, T. 1997. Molecular variability of the genomes of *Capilloviruses* from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* 87. 389-396 p.
- Mahfoudhi, N., Moujahed, R., Salleh, W., El Air, M., Djelouah, K. 2011. First Report Of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* in Tunisian Pear Orchards. *Journal of Plant Pathology* 93 (4). 63-89 p.
- Mahfoudhi, N., El Air, M., Moujahed, R., Salleh, W., Djelouah, K. 2013. Occurrence and distribution of pome fruit viruses in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 52 (1). 136-140 p.
- Malinowski, T., Cieslinska, M., Zawadzka, B., Interewicz, B., Porebska, A. 1997. Characterisation of monoclonal antibodies against *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and their application for detection of ACLSV and identification of its strains. *Phytopathologica Polonica* 14. 35-40 p.
- Malinowski, T., Komorowska, B., Golis, T., Zawadzka, B. 1998. Detection of *Apple stem pitting virus* and *pear vein yellows virus* using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Horticulture* 472. 87-95 p.
- Martelli, G. P., Jelkmann, W. 1998. *Foveavirus*, a new plant virus genus. *Archives Virology* 143. 1245-1249 p.
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., Dolja, V. V. 2007. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Revue of Phytopathology* 45. 73-100 p.
- Massart, S., Jijakli, M. H., Kummert, J. 2011. *Apple stem grooving virus* in Pome Fruits. 7th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 29-33 p.
- 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(1). 139-147 p.
- Matic, S., Sanchez-Navarro, J. A., Mandic, B., Myrta, A., Pallas, V. 2008. Tracking three *Iarviruses* in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology* 90. 137-141 p.
- 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 Virology Methods* 99. 81-92 p.
- Mink, G. I., Shay, J. R. 1959. Preliminary evaluation of some Russian apple varieties as indicators for apple viruses. *Plant Diseases* 254. 13-17 p.
- Mink, G. I., Shay, J. R., Gilmer, R. M., Stouffer, R. F. 1971. Latent viruses of apple II. Symptoms in woody indicators and strain variation. N. Y. Agriculture Expert Station. *Search Agriculture Bulletin* 1. 9-15 p.
- Mink, G. I., Howell, W. E., Cole, A., Regev, S. 1987. Three serotypes of *Prunus necrotic ringspot virus* isolated from rugose mosaic-diseased sweet cherry in Washington. *Plant Diseases* 71. 91-93 p.
- Mink, G. I. 1989. *Apple mosaic virus*. In: *Virus and virus like diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Ed. P. R. Fridlund. Pullman: Cooperative extension college of agriculture and home economics, Washington state university. 34-39 p.
- Mink, G. I., Wample, R., Howell, W. E. 1998. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival. In: *Plant virus disease control*. Ed. Hadidi, A., Khetarpal, R. K., Koganezawa, H. APS Press, St. Paul, MN, USA. 294-300 p.
- Mitra D., Kootstra, A. 1993. Isolation of RNA from apple skin. *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 326-332.

- Miyakawa, T., Ito, T. 2000. Tatter leaf-citrange stunt. In: Compendium of citrus diseases 2nd. Ed. Timmer, L. W., Garnsey, S. M., Graham, J. H. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 60 p.
- Mumford R.A., Walsh, K., Barker, I., Boonham, N. 2000. Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90. 448–453 p.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G. P. 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: *Virus and Virus-like Diseases of Stone Fruits, with Particular Reference to the Mediterranean Regions*. Ed. Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. Options Mediterranean Serie B, 45, CIHEAM. 15-23 p.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Stamo, B., Rwahnih, M. A., Savino, V., Carraro, L. 2004. A preliminary account of the presence of pome fruit viruses in Albania. *Acta Horticulture* 657. 55-58 p.
- Myrta, A., Matic, S., Malinowski, T., Pasquini, G., Candresse, T. 2011. *Apple chlorotic leaf spot virus* in Stone Fruits. 17th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 85-90 p.
- Navarro, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae* 227. 43-55 p.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J. A., Verderevskaya, T. 1995. Sensitive detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR or multiplex IC-RT-PCR. *Acta Horticulture* 386. 51-62 p.
- Neméth, M. 1986. Viruses, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Norwell, MA, USA: Kluwer academic publishers.
- Nickel, O., Targon, M. L. P. N., Fajardo, T. V. M., Machado, M. A., Trivilin, A. P. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29. 558-562 p.
- Nickel O., Fajardo T. V.M.; Jelkmann W., Kuhn G. B. 2001. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of apple stem grooving virus, and its survey in southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 3.
- Ohira, K., Namba, S., Rozanov, M., Kusumi, T., Tsuchizaki, T. 1995. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of *Citrus tatter leaf capillovirus*: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *Journal of General Virology* 76. 2305–2309 p.
- Paduch-Cichal, E., Tomala, K. 2007. Detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Apple stem grooving virus* in different tissues of Mutsu apple cultivar trees by ELISA. *Phytopathologica Polonica* 43. 53-59 p.
- Pallás V., Llancer, G., Cambra, M. 1998. Sanitary status of stone fruit industry in the Mediterranean countries: Spain. In: *Options Mediterranean. Stone fruit viruses and certification in the Mediterranean countries: problems and prospects* (A. Myrta, B. Di Terlizzi, V. Savino, ed.), Ciheam/ Mediterranean Agronomic Institute, Bari, Italy. 61-64 p.
- Pandey R.N., Adams, P., Flournoy, R. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 14. 17-22 p.
- Pasquini, G., Faggioli, F., Pilotti, M., Lumia, V., Barba, M. 1998. Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Italy. *Acta Horticulture* 472. 195-202 p.
- Paunovic, S. 1995. Double-stranded RNA associated with fruit deformation of quince. *Acta Horticulture* 386. 45-50 p.
- Paunovic, S., Rankovic, M. 1998. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. *Acta Horticulture* 472. 125-133 p.
- Paunovic, S., Maksimovic, V., Rankovic, M., Radovic, S. 1999. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Wurttemberg. *Journal of Phytopathology* 147. 695-700 p.
- Paunovic, S., Jevremovic, D. 2004. *Apple stem pitting virus* detection from dormant pome fruits by RT-PCR. *Acta Horticulture* 657. 45–49 p.
- Paunovic, S., Pasquini, G., Barba, M. 2011. *Apple mosaic virus* in Stone Fruits. 18th chapter in *Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits*. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 91-95p.
- Pethybridge, S. J., Wilson, C. R., Hay, F. S., Leggett, G. W., Sherriff, L. J. 2002. Mechanical transmission of *Apple mosaic virus* in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens. *Annals of Applied Biology* 141. 77–85 p.
- Petrzik, K., Lenz, O. 2002. Remarkable variability of *Apple mosaic virus* capsid protein gene after nucleotide position 141. *Archives of Virology* 147. 1275–1285 p.
- Petrzik, K. 2005. Capsid protein sequence gene analysis of *Apple mosaic virus* infecting pears. *European Journal of Plant Pathology* 111. 355–360 p.

- Petrzik, K., Lenz, O. 2011. *Apple mosaic virus* in Pome Fruits. 6th chapter in Virus and Virus-like diseases of Pome and Stone fruits. Ed. Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. ISBN – 978-0-89054-396-2. 25-28 p.
- 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 p.
- Polák J., Svoboda, P. 1989. Preliminary results of screening hop varieties and clones for the presence of some hop viruses in Czechoslovakia using ELISA. In: Proceedings, International Workshop on hop virus diseases. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft. 27-32 p.
- Polák, J., Svoboda, J. 2006. The reliability of detection and the distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pears in the Czech Republic. *Horticulture Science (Prague)* 33 (1). 7–10 p.
- Polák, Z., Zieglerová, J. 1997. Spontaneous occurrence of *Apple mosaic virus* in some forest and ornamental woody species. XIVth Slovak and Czech Plant Protection Conference, Nitra. 87–89 p.
- Polák, J., Zieglerová, J., Bouma, J. 1997. Diagnosis and distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pome fruits in the Czech Republic. *Horticulture Science (Prague)* 24. 89-94 p.
- Polák, J., Zieglerová, J. 2001. Distribution of *Apple stem grooving virus* in apple trees in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 37. 1-4 p.
- Popescu, S., Constantin, G., Mazilu, C. 2004. Apple viral diseases diagnosed in the gerplasm collection at ICDP Maracineni – Romania. *Acta Horticulture* 657. 51-54 p.
- Posnette, A. F., Elenberger, E. C. 1957. The line pattern virus disease of plum. *Annals of Applied Biology* 45. 74-80 p.
- Posnette A.F., 1963. Virus diseases of apples and pears. Technical Communication of Bureau Horticulture in East Malling 30. 141 p.
- Postman, J. D. 2002. Disease caused by viruses: Hazelnut mosaic. In: Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones. Ed. Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W. APS Press, St. Paul, MN, USA. 49 p.
- Postman J.D., Mehlenbacher S.A. 1994. *Apple mosaic virus* in hazelnut germplasm. *Acta Horticulturae* 351. 601-609 p.
- Postman, J. D., DeNoma, J. S., Reed, B. M. 2005. Detection and Elimination of Viruses in USDA Hop (*Humulus lupulus*) Germplasm Collection. *Acta Horticulture* 668.
- Poul, F., Dunez, J. 1989. Production and use of monoclonal antibodies for the detection of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of Virological Methods* 25. 153-165 p.
- Poul, F., Dunez, J. 1990. Use of monoclonal antibodies for the identification of different antigenic domains in Apple chlorotic leaf spot virus. *Archives of Virology* 114. 191-202 p.
- Pupola, N., Morocko-Bicevska, I., Kale, A., Zeltins, A. 2011. Occurrence and Diversity of Pome Fruit Viruses in Apple and Pear Orchards in Latvia. *Journal of Phytopathology* 159. 597–605 p.
- 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. 605–615 p.
- Rana, T., Chandel, V., Hallan, V., Zaidi, A. A. 2007. Molecular evidence for *Apple chlorotic leaf spot virus* in wild and cultivated apricot in Himachal Pradesh, India. *Journal of Plant Pathology* 89. 69-76 p.
- Ribicki, E. P. 1995. The *Bromoviridae*. Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. 450–457 p.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107. 411–420 p.
- Rouag, N., Guechi, A., Matic, S., Myrta, A. 2008. Viruses and viroids of stone fruits in Algeria. *Journal of Plant Pathology* 90. 393–395 p.
- Roussel, S., Kummert, J., Salmon, M., Dutrecq, O., Jijakli, M. H. 2005. Development of RT-PCR assays using fluorogenic-3' minor groove binder DNA probes for detection of fruit tree viruses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35. 105–108 p.
- Rowhani, A., Maningas, M. A., Lile, L. S., Daubert, S. D., Golino, D. A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology* 85. 347-352 p.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Ed. Krawetz, S., Misener, S. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386 p.

- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J. A., Herranz, M. C., Myrta, A., Di Terlizzi, B., Pallas, V. 2000. Simultaneous detection of the three *Iilarviruses* affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90. 1330-1336 p.
- Saitou, N., Nei, M.; 1987; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees; *Molecular Biology and Evolution* vol. 4; 406-425p.
- Salem, N., Mansour, A., Al-Musa, A. 2005. Viruses of pome fruit trees in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 87 (2). 123-126 p.
- Salmon, M. A., Vendrame, M., Kummert, J., Lepoivre, P. 2002. Rapid and homogenous detection of Apple stem pitting virus by RT-PCR and fluorogenic 3' minor groove binder-DNA probe. *European Journal of Plant Pathology* 108. 755-762 p.
- Sánchez-Navarro, J. A., Pallás, V. 1994. Nucleotide sequence of *Apple mosaic ilarvirus* RNA 4. *Journal of General Virology* 75. 1441–1445 p.
- 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* 69. 1503-1507 p.
- Sawamura, K., Yamashita, K., Aria, K. 1988. An *Apple stem grooving strain* isolated from European pear (*Pyrus communis*). *Bulletin of Faculty of Agriculture, Hirosaki University*. 50. 22–26 p.
- Schmidt, H. 1972. The effect of 'latent' virus infections on the yield of maiden trees on 20 469 apomictic apple seedling rootstocks. *Journal of Horticultural Sciences* 47. 159-163 p.
- Schwarz K., Jelkmann W. 1998 Detection and characterization of *Apple stem pitting virus* sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. *Acta Horticulturae* 472. 75-85 p.
- Sedlák J., Špak J., Paprštejn F., Příbylová J., Svobodová L., Kubelková D. 2014. Metodika ozdravování rybízu od virů a fytoplazem [certifikovaná metodika].
- Sertkaya, G. 2010. Detection of Pear Vein Yellows Disease caused by *Apple stem pitting virus* (ASPV) in Hatay province of Turkey. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kuhn-Archiv. 427 p.
- Shiel, P. J., Alrefai, R. H., Domier, L. L., Korban, S. S., Berger, P. H. 1995. The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* RNA-3. *Archives of Virology* 140. 1247–1256 p.
- Shiel, P. J., Berger, P. H. 2000. The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* (ApMV) RNA 1 a RNA 2: ApMV is more closely related to *Alfalfa mosaic virus* than other *Iilarviruses*. *Journal of General Virology* 81. 273–278 p.
- Schmitz M., Noga, G. 2000. Ausgewählte pflanzliche Inhaltsstoffe und ihr antioxidatives potential in hydrophilen und lipophilen extracten von *Phaseolus vulgaris*, *Malus domestica* und *Vitis vinifera*. *Blättern. Gartenbauwissenschaft* 65. 65-73 p.
- Spiegel, S., Thompson, D., Varga, A., Rosner, A., James, D. 2005. An *Apple chlorotic leaf spot virus* isolate from ornamental dwarf flowering almond (*Prunus glandulosa* 'Sinensis'): detection and characterization. *Horticulture Science* 40. 1401–1404 p.
- Stankiene, K., Maeikiene, I., Gelvonauskiene, D., Siksniene, K. B., Bobinas, C. 2012. Virological assessment of stock planting material of apple and raspberry cultivars. *Zemdirbystete=Agriculture* 99. 93-98 p.
- Staub U., Polivca, H., Gross, H.J. 1995. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. *Journal of Virological Methods* 52. 209-218 p.
- Stewart S., Nassuth, A. 2001. RT-PCR based detection of *Rupestris stem pitting associated virus* within field-grown grapevines throughout the year. *Plant Disease* 85. 617-620 p.
- Stouffer, R. F., Fridlund, P. R. 1989. In: Indexing using woody indicators, SP0003 edn. Ed. Fridlund, P. R. Washington State University Cooperative Extension, Pullman. 255-265 p.
- Svoboda, P. 1993. The presence of carlaviruses and ilarviruses in Czech hop varieties using ELISA. *Ochrana rostlin* 29. 259–264 p.
- Svoboda, J., Polák, J. 2010. Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. *Horticulture Science* 37. 22–26 p.
- Sweet, J. B. 1980. Fruit tree virus infections of woody exotic and indigenous plants in Britan. *Acta Phytopathologica* 15. 231–238 p.
- Sweet J.B., Barbara D. 1979. A yellow mosaic disease of horse chestnut (*Aesculus* spp.) caused by *Apple mosaic virus*. *Annals of Applied Biology* 92, 335-341.
- Takahara, T., Kawase, K., Ono, S., Iwagaki, I., Hirose, K., Yoshinaga, K. 1988. Rootstocks for Pnkan (*Citrus reticulata* Blanco) in relation to Tatter leaf virus. *Bulletin of Fruit Trees of Research Station. D* 10. 35-45 p.

- Takahashi, T., Saito, N., Goto, M., Kawai, M. 1990. *Apple stem grooving virus* isolated from Japanese apricot (*Prunus mume*) imported from China. Res. Bulletin of Plant Protection Series Japonica. 26. 15–21 p.
- Tang, J., Olson, J. D., Ochoa-Corona, F. M., Clover, G. R. G. 2010. *Nandina domestica*, a new host of *Apple stem grooving virus* and *Alternanthera mosaic virus*. Australasian Plant Disease Notes 5. 25–27 p.
- Tatineni, S., Afunian, M. R., Gowda, S., Hilf, M.E., Bar-Joseph, M. 2009. Characterization of the 59- and 39-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: Evidence for a CP subgenomic RNA. Virology 385. 521–528 p.
- Teycheney, P.Y., Laboureau, N., Iskre-Caruana, M.L., Candresse, T., 2005. High genetic variability and evidence for plant to plant transfer of *Banana mild mosaic virus*. Journal of General Virology 86. 3179–3187 p.
- Thokchom, T., Rana, T., Hallan, V., Ram, R. R., Zaidi, A. A. 2009. Molecular characterization of the Indian strain of *Apple mosaic virus* isolated from apple (*Malus domestica*). Phytoparasitica 37. 375–379 p.
- Thomsen, A. 1975. Crop reduction in pear trees caused by virus infection. Acta Horticulture 44. 119–122 p.
- Thomsen, A. 1989. Pear stony pit. In: Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders. Ed. Fridlund, P. R. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, Pullman. 182–187 p.
- Torrance, L., Dolby, C. A. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three *Iilarviruses* in fruit trees. Annals of Applied Biology 104. 267–276 p.
- Tóth M., Kása K., Szani Z., Balikó E. 2005 (a). Traditional old apple cultivars as new gene sources for apple breeding. Acta Horticulturae 663. 609–612 p.
- Tóth M., Honty K., Hevesi M. 2005 (b). Fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility of old Hungarian apple cultivars. International Journal of Horticulture Science 11. 35–39 p.
- Van der Meer, F. A. 1976. Observation on apple stem grooving virus. Acta Horticultureae 67, 293–304.
- Ulubas, C., Ertunc, F. 2005. *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV) Status in Turkey and Sensitive Detection Using Advanced Techniques. Turkish Journal for Agriculture 29. 251–257 p.
- Uzunogullari N., Ilbagi, H. 2009. Identification of *Apple mosaic ilarvirus* on pome fruits in south eastern Marmara region of. Bahce 38. 9–14 p.
- Van der Meer, F. A. 1976. Observation on *Apple stem grooving virus*. Acta Horticulture 67. 293–304 p.
- Van der Meer, F. A. 1986. Observation on the etiology of some virus diseases of apple and pear. Acta Horticulture 193. 73–74 p.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. 2000. Virus taxonomy, Seventh report of international committee on taxonomy of viruses. Academic press, NY.
- Varveri, C., Bem, F. 1995. Viruses of stone and pome fruits mother-three plantations in Greece. Acta Horticulturae 386. 431–438 p.
- Waller, J. M., Lenné, J. M., Waller, S. J. 2002. Plant pathologist's pocketbook. CABI publishing; NY, USA; 3th edition. ISBN 0-85199-459-8. 516 p.
- Wang, L., Wang, G., Hong, N., Tang, R., Deng, X., Zhang, H. 2006. Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* for *in vitro*-cultured pear shoot tips. Horticulture Science 41. 729–732 p.
- Watpade, S., Raigond, B., Thakur, P. D., Handa, A., Pramanick, K. K., Sharma, Y. P., Tomar, M. 2012. Molecular detection of *Latent apple chlorotic leaf spot virus* in elite mother plants of apple. Indian Journal of Virology 23. 359–363 p.
- Weller, S., J. Elphinstone, N. Boonham, D. Stead, 2000. Detection of *Ralstonia Solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, realtime, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2853–2858 p.
- Welsh, M. F., Nyland, G. 1965. Elimination and separation of viruses in apple clones by exposure to dry heat. Canadian Journal of Plant Sciences 45. 443–454 p.
- Winkowska, L., Grimová, L., Ryšánek, P. unpublished (a). Detekce vybraných virů infikujících stromy jableň. Certifikovaná metodika. V RECENZNÍM ŘÍZENÍ
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P. unpublished (b). Occurrence of several viruses infecting wild growing stone fruit trees in central bohemia. Scientia Agriculturae Bohemica. V RECENZNÍM ŘÍZENÍ
- Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T., Yoshikawa, N. 2007. Combination of two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* are crucial for infectivity. Journal of General Virology 88. 2611–2618 p.
- Yanase, H. 1974. Studies on apple latent viruses in Japan. Bulletin of Fruit Tree Research Station, Japan, Serie C. 47–109 p.

- Yanase, H., Yamaguchi, A., Mink, G. I., Sawamura, K. 1979. Back transmission of *Apple chlorotic leaf spot virus* (type strain) to apple, and production of apple topworking disease symptoms in Maruba kaido (*Malus prunifolia* Borkh. var. *ringo* Asami). *Annals of Phytopathologica Society Japonica* 45. 369-374 p.
- Yanase, H., Mink, G. I., Sawamura, K., Yamaguchi, A. 1990. Apple topworking disease. In: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. Ed. Jones, A. L., Aldwinckle, H.S. APS, St. Paul, MN. 74-75 p.
- 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 p.
- Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M., Takahashi, T. 1992. The nucleotide sequence of *Apple stem grooving capillovirus* genome. *Virology* 191. 98-105 p.
- Yoshikawa, N., Sasamoto, K., Sakurada, M., Takashi, T., Yanase, H. 1996. Apple stem grooving and Citrus tatter leaf capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Annals of Phytopathologica Society Japonica* 62. 119-124 p.
- Yoshikawa, N. 2000. Apple stem grooving virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses no. 376. Egham, UK: CABI Bioscience.
- Yoshikawa, N. 2001. *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI AAB Description of Plant Viruses 386.
- Yoshikawa, N., Matsuda, H., Oda, Y., Isogai, M., Takahashi, T. 2001. Genome Heterogeneity of *Apple Stem Pitting Virus* in apple trees. In: *Acta Horticulture*. Ed. M. F. Clark. 285-290 p.
- Youssef, S. A., Moawad, S. M., Nosseir, F. M., Shalaby, A. A. 2010. Detection and identification of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* affecting apple and pear trees in Egypt. *International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops*. *Julius-Kuhn-Archiv* 427. 253-256 p.
- Zahn, V. 1996. Obstvirustestung im Wandel der Zeit. *Obstbau* 21. 547-550 p.

9. Seznam příloh

Tabulky:

Tabulka I. Sady, zahrady a volně rostoucí stromy v Praze a okolí testované na přítomnost ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.

Tabulka II. Vzorky testované na přítomnost ApMV v průběhu roku 2015.

Tabulka III. Vzorky testované na přítomnost ASGV v průběhu roku 2015.

Tabulka IV. Vzorky testované na přítomnost ASPV v průběhu roku 2015.

Tabulka V. Vzorky testované na přítomnost ACLSV v průběhu roku 2015.

Tabulka VI. Směsné infekce v sadech a školce.

Tabulka VII. Směsné infekce ostatní.

Tabulka VIII. Rozšíření ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní ze sadu u Uherského Brodu.

Tabulka IX. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ApMV.

Tabulka X. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ApMV.

Tabulka XI. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ASGV.

Tabulka XII. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ASGV.

Tabulka XIII. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ASPV.

Tabulka XIV. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ASPV.

Tabulka XV. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ACLSV.

Tabulka XVI. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ACLSV.

Obrázky:

Obrázek I. Výsledné grafy při absolutní kvantifikaci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou qRT-PCR.

Obrázek II. Optimalizované standardní křivky pro qRT-PCR.

Obrázek III. Křivky tání pro qRT-PCR.

10. Seznam publikací

- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P.; 2016: Apple mosaic virus – Review. *Phytopathologia Mediterranea* 55 (1). 1-19 s.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Quantitative detection of four pome fruit viruses by one-step qRT-PCR in apple trees throughout the year. *Phytopathologia Mediterranea*. V TISKU
- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P., Marek M.; 2016: Evidence for four main apple viruses in old extensive orchards, gardens and in the wild growing trees. *Plant Pathology*. V RECENZNÍM ŘÍZENÍ
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Occurrence of several viruses infecting wild growing stone fruit trees in central bohemia. *Scientia Agriculturae Bohemica*. V RECENZNÍM ŘÍZENÍ
- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P., Svoboda P., Petrzik K., 2013: Reflects the coat protein variability of apple mosaic virus host preference? *Virus genes* 47:1, 119–125 s.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P., 2013: Virus mozaiky jabloně. *Zahradnictví* 11. 14-17 s.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Detekce čtyř hlavních jabloňových virů v různých typech biologického materiálu pomocí sérologických (DAS/I ELISA) a molekulárně genetických metod (RT-PCR a qRT-PCR). Certifikovaná metodika. V RECENZNÍM ŘÍZENÍ

Přílohy

Tabulky

Tabulka I. Sady, zahrady a volně rostoucí stromy v Praze a okolí testované na přítomnost ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. Označení je popisek lokality znázorněné na mapě.

Označení	Lokalita	Počet vzorků	Typ výsadby	GPS souřadnice
1Z	Únětice	25	zahrada	50.14931, 14.3605
2Z	Únětice	9	zahrada	50.14906, 14.36077
3Z	Únětice	4	zahrada	50.14951, 14.36011
1S	Tiché Údolí – Roztoky	8	sad	50.14995, 14.38651
2S	Praha (Suchdol) – Roztoky	13	sad	50.15061, 14.37397
3S	Praha (Lysolaje – Housle)	17	sad	50.12506, 14.36532
4S	Praha (Kozí Hřbety)	13	sad	50.14711, 14.37221
5S	Praha (Vokovice - Na Krutci)	11	sad	50.10227, 14.3508
6S	Praha (Sedlec)	2	sad	50.12965, 14.38998
7S	Praha (Motol - Nad Kalvárií)	7	sad	50.06609, 14.3296
8S	Praha (Vysočany – Klíčany)	3	sad	50.11467, 14.5154
9S	Praha (Běchovice - U Stacha)	9	sad	50.07636, 14.62297
10S	Praha (Vinoř – Ctěnický zámek)	5	sad	50.14896, 14.56488
11S	Praha (Suchdol)	6	sad	50.1277, 14.37364
1P	Praha (Kozí Hřbety u kapličky)	18	volně rostoucí	50.14468, 14.37078
2P	Praha (Tiché údolí)	5	volně rostoucí	50.14759, 14.38419
3P	Praha (Údolí Únětického potoka)	15	volně rostoucí	50.14613, 14.37337
4P	Praha (Šárka)	2	volně rostoucí	50.10544, 14.36174
5P	Praha (Červený vrch)	2	volně rostoucí	50.09734, 14.35192
6P	Praha (Kozí Hřbety)	4	volně rostoucí	50.14489, 14.36812

Tabulka II. Vzorky testované na přítomnost ApMV v průběhu roku 2015. Tabulka zobrazuje kolik vzorků z pěti testovaných z každé jabloňové odrůdy, bylo danou metodou v uvedeném měsíci vyhodnoceno jako pozitivní na přítomnost ApMV. U všech použitých odrůd byla potvrzena při předchozím testování metodou RT-PCR směsná infekce čtyřmi viry – ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. N/A – v daném období nebylo měření provedeno.

<u>ApMV</u>	Datum odběru Detekční metoda	III./IV.			VI.			IX.			XII.		
		ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR
Materiál	Odrůda												
	Rubín	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bohemia	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pupeny	Topaz	5/5	3/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	4/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Rubín	1/5	3/5	5/5	0/5	4/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	4/5	5/5
lýko	Bohemia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	4/5	5/5	0/5	2/5	4/5
	Topaz	1/5	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	2/5	2/5
	Angold	0/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	0/5	3/5	5/5	0/5	3/5	5/5
	Idared	2/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	4/5
	Rubín	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
listy	Bohemia	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Topaz	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Rubín	4/4	4/4	4/4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
květy	Bohemia	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabulka III. Vzorky testované na přítomnost ASGV v průběhu roku 2015. Tabulka zobrazuje kolik vzorků z pěti testovaných z každé jabloňové odrůdy, bylo danou metodou v uvedeném měsíci vyhodnoceno jako pozitivní na přítomnost ASGV. U všech použitých odrůd byla potvrzena při předchozím testování metodou RT-PCR smíšená infekce čtyřmi viry – ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. N/A – v daném období nebylo měření provedeno.

ASGV	Datum odběru Detekční metoda	III./IV.			VI.			IX.			XII.		
		ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR
Materiál	Odrůda												
	Rubín	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pupeny	Bohemia	5/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	4/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
lýko	Rubín	3/5	2/5	5/5	0/5	3/5	5/5	2/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5
	Bohemia	2/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5
	Topaz	2/5	2/5	5/5	1/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5
	Angold	3/5	3/5	5/5	0/5	4/5	5/5	1/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5
	Idared	2/5	4/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5
listy	Rubín	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Bohemia	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Topaz	3/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	1/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
květy	Rubín	2/4	2/4	4/4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bohemia	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	2/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	4/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabulka IV. Vzorky testované na přítomnost ASPV v průběhu roku 2015. Tabulka zobrazuje kolik vzorků z pěti testovaných z každé jabloňové odrůdy, bylo danou metodou v uvedeném měsíci vyhodnoceno jako pozitivní na přítomnost ASPV. U všech použitých odrůd byla potvrzena při předchozím testování metodou RT-PCR směsná infekce čtyřmi viry – ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. N/A – v daném období nebylo měření provedeno.

ASPV	Datum odběru Detekční metoda	III./IV.			VI.			IX.			XII.		
		ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR
Materiál	Odrůda												
	Rubín	4/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Bohemia	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pupeny	Topaz	5/5	2/5	3/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	3/5	4/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Rubín	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
lýko	Bohemia	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Topaz	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Angold	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5
	Idared	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5
	Rubín	4/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A
listy	Bohemia	5/5	2/5	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	3/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Topaz	4/5	2/5	5/5	5/5	3/5	5/5	2/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	3/5	3/5	5/5	0/5	5/5	3/5	2/5	5/5	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	3/5	4/5	5/5	1/5	4/5	3/5	3/5	3/5	N/A	N/A	N/A
	Rubín	4/4	2/4	2/4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
květy	Bohemia	3/5	0/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	4/5	1/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	4/5	1/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	4/5	2/5	2/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabulka V. Vzorky testované na přítomnost ACLSV v průběhu roku 2015. Tabulka zobrazuje kolik vzorků z pěti testovaných z každé jablonořové odrůdy, bylo danou metodou v uvedeném měsíci vyhodnoceno jako pozitivní na přítomnost ACLSV. U všech použitých odrůd byla potvrzena při předchozím testování metodou RT-PCR smíšená infekce čtyřmi viry – ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV. N/A – v daném období nebylo měření provedeno.

<u>ACLSV</u>	Datum odběru Detekční metoda	III./IV.			VI.			IX.			XII.			
		ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	ELISA	RT-PCR	qRT-PCR	
Materiál	Odrůda													
	Rubín	5/5	0/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pupeny	Bohemia	5/5	0/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	2/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Rubín	5/5	1/5	5/5	3/5	3/5	5/5	4/5	3/5	5/5	5/5	3/5	3/5	5/5
lýko	Bohemia	5/5	2/5	5/5	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5
	Topaz	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	5/5
	Angold	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5
	Idared	5/5	4/5	5/5	2/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	5/5
	Rubín	2/5	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A
listy	Bohemia	5/5	0/5	5/5	5/5	3/5	5/5	0/5	5/5	4/5	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	4/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	2/5	5/5	5/5	1/5	5/5	0/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	2/5	5/5	5/5	4/5	5/5	1/5	3/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A
	Rubín	4/4	0/4	4/4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
květy	Bohemia	5/5	0/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Topaz	5/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Angold	5/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	Idared	5/5	4/5	5/5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabulka VI. Směsné infekce v sadech a školce. Zobrazen počet případů směsných infekcí ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní pěstovaných v sadech a ve školce.

ŠKOLKA+SADY		Uh. Brod	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S	11S	Celkem sady
4 viry	ApMV, ASGV, ASPV, ACLSV	7	0	5	0	0	0	0	0	0	2	0	3	10
	ApMV, ASGV, ASPV	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	ApMV, ASGV, ACLSV	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
3 viry	ApMV, ASPV, ACLSV	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ASGV, ASPV, ACLSV	12	0	5	9	2	4	1	2	0	3	0	0	26
	Celkem	15	0	5	10	5	4	1	2	0	3	0	1	31
	ApMV, ASGV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ApMV, ASPV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ApMV, ACLSV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 viry	ASGV, ASPV	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	ASGV, ACLSV	2	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	4
	ASPV, ACLSV	23	4	2	1	1	2	1	3	0	4	0	0	18
	Celkem	27	4	3	2	3	3	1	3	0	4	0	0	23
	ApMV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 vir	ASGV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ASPV	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
	ACLSV	5	1	0	0	4	1	0	1	0	0	0	0	7
0 detekovaných virů		1	0	0	5	1	2	0	1	3	0	5	2	19
Celkem rostlin		57	8	13	17	13	11	2	7	3	9	5	6	94

Tabulka VII. Směsné infekce ostatní. Zobrazen počet případů směsných infekcí ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní pěstovaných v zahradách a u volně rostoucích jabloní.

		1Z	2Z	3Z	Celkem zahrady	Volně rostoucí
4 viry	ApMV, ASGV, ASPV, ACLSV	12	0	1	13	0
	ApMV, ASGV, ASPV	0	0	0	0	1
	ApMV, ASGV, ACLSV	0	0	0	0	0
3 viry	ApMV, ASPV, ACLSV	0	0	0	0	0
	ASGV, ASPV, ACLSV	6	0	2	8	0
	Celkem	6	0	2	8	1
	ApMV, ASGV	0	0	0	0	0
	ApMV, ASPV	0	1	0	1	0
	ApMV, ACLSV	0	0	0	0	0
2 viry	ASGV, ASPV	0	1	0	1	1
	ASGV, ACLSV	0	1	0	1	0
	ASPV, ACLSV	4	1	1	6	0
	Celkem	4	4	1	9	1
	ApMV	0	0	0	0	0
1 vir	ASGV	0	0	0	0	1
	ASPV	0	0	0	0	2
	ACLSV	1	0	0	1	0
0 detekovaných virů		2	5	0	7	41
Celkem rostlin		25	9	4	38	46

Tabulka VIII. Rozšíření ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV u jabloní ze sadu u Uherského Brodu. Zobrazen výskyt ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV v různých odrůdách a na dvou podnožích jabloní.

(+) virus byl detekován; (-) virus nebyl detekován.

Uherský Brod		VIRUS			
PODNOŽ	ODRŮDA	ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV
semenáč	Granát třebívlický	-	+	+	+
	Velímek červený	-	-	+	+
	Hammersteinovo	+	+	+	+
	Limburské	-	-	-	+
	Madame Gelopine	-	-	+	+
	Wessenrovo	-	+	-	+
	Reneta suxova	-	+	-	+
	Ananasová reneta	-	-	+	-
	Vilémovo	-	-	+	+
	Londýnské	-	-	+	+
	Ribstonské	-	+	+	+
	Matčino	-	-	+	+
	Kardinál žíhaný	-	-	-	+
	Sikulské	+	-	+	+
	Lord Saiffielt	-	-	+	+
	Paegasovo	+	+	+	+
	Car Alexander	-	-	+	+
	Booscopské červené	+	+	+	+
	Jadernička moravská	-	-	-	-
	Gdaňský hranáč	-	-	-	+
	Boikovo	-	-	+	+
	Gravštýnské červené	-	-	+	+
	Strachán bílý	-	-	+	+
	Knížecí zelené	-	-	+	-
	Míšenské	-	-	+	+
	Strýmka	-	-	+	+
	Haklova muškátová reneta	-	+	+	+
	Řechtáč soudkovitý	-	-	+	+
	Eduardovo	-	+	+	-
	Červené tvrdé	-	-	+	+
	Strýmka červená	-	-	+	+
	Gustavovo trvanlivé	-	-	+	+
Isabella Lousietta	-	+	+	+	
Pogáč červený	+	+	+	+	
Grahamovo	-	-	+	+	
Čistecké	+	+	-	+	
Korunní princ Rudolf	-	+	+	+	
Zuckalmagliova Reneta	-	-	+	+	
Borovinka	-	+	+	+	
A2	Sibírské	+	+	+	+
	Lamberská Reneta	-	-	+	+
	Kanadská Reneta	-	-	+	+
	Bleinchemská Reneta	+	+	+	+

Tabulka VIII. Pokračování

Uherský Brod		VIRUS			
PODNOŽ	ODRŮDA	ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV
A2	Bermské růžové	+	+	+	+
	Aurora	+	-	+	+
	Malinové podzimní	-	-	-	+
	Waterlické mramorové	-	+	+	+
	Bismarkovo	-	+	+	-
	James Grieve	-	+	+	+
	Gaskoňské šarlatové	-	+	+	+
	Booscopské červené	-	+	+	+
	Sudetská reneta	-	-	+	+
	Opat Bruno	-	+	+	+
	Gravštýnské	-	-	+	+
	Hedvábné červené letní	-	-	-	+
	Banánové zimní	-	+	+	+
	Booscopské	-	-	+	+

Tabulka IX. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ApMV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

nt	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10	iso 11 Bel	iso 12 Bra	iso 13 Ind	iso 14 Kor
iso 1	ID	99%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	99%	96%	92%	98%	96%	92%
iso 2	99%	ID	99%	99%	98%	98%	97%	98%	99%	97%	93%	98%	97%	92%
iso 3	99%	99%	ID	99%	99%	99%	98%	98%	99%	96%	93%	99%	97%	92%
iso 4	99%	99%	99%	ID	99%	99%	98%	99%	99%	97%	93%	99%	97%	93%
iso 5	99%	98%	99%	99%	ID	99%	98%	99%	99%	96%	93%	99%	97%	92%
iso 6	99%	98%	99%	99%	99%	ID	98%	98%	99%	96%	93%	99%	96%	92%
iso 7	98%	97%	98%	98%	98%	98%	ID	99%	98%	96%	92%	98%	96%	92%
iso 8	98%	98%	98%	99%	99%	98%	99%	ID	98%	96%	93%	98%	96%	92%
iso 9	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	ID	96%	93%	99%	97%	93%
iso 10	96%	97%	96%	97%	96%	96%	96%	96%	96%	ID	92%	96%	97%	92%
iso 11 Bel	92%	93%	93%	93%	93%	93%	92%	93%	93%	92%	ID	93%	92%	92%
iso 12 Bra	98%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	99%	96%	93%	ID	97%	92%
iso 13 Ind	96%	97%	97%	97%	97%	96%	96%	96%	97%	97%	92%	97%	ID	93%
iso 14 Kor	92%	92%	92%	93%	92%	92%	92%	92%	93%	92%	92%	92%	93%	ID

Tabulka X. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ApMV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

aa	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10	iso 11 Bel	iso 12 Bra	iso 13 Ind	iso 14 Kor
iso 1	ID	99%	99%	100%	99%	98%	98%	98%	99%	97%	94%	99%	98%	84%
iso 2	99%	ID	99%	99%	99%	99%	98%	98%	100%	97%	95%	100%	98%	85%
iso 3	99%	99%	ID	100%	99%	98%	98%	98%	99%	97%	94%	99%	98%	84%
iso 4	100%	99%	100%	ID	99%	99%	99%	99%	100%	97%	95%	100%	98%	85%
iso 5	99%	99%	99%	99%	ID	98%	99%	99%	99%	96%	94%	99%	97%	84%
iso 6	98%	99%	98%	99%	98%	ID	98%	98%	99%	96%	93%	99%	97%	84%
iso 7	98%	98%	98%	99%	99%	98%	ID	98%	99%	96%	93%	99%	97%	84%
iso 8	98%	98%	98%	99%	99%	98%	98%	ID	99%	96%	93%	99%	97%	84%
iso 9	99%	100%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	ID	97%	94%	100%	98%	84%
iso 10	97%	97%	97%	97%	96%	96%	96%	96%	97%	ID	93%	97%	96%	84%
iso 11 Bel	94%	95%	94%	95%	94%	93%	93%	93%	94%	93%	ID	94%	94%	83%
iso 12 Bra	99%	100%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	94%	ID	98%	84%
iso 13 Ind	98%	98%	98%	98%	97%	97%	97%	97%	98%	96%	94%	98%	ID	84%
iso 14 Kor	84%	85%	84%	85%	84%	84%	84%	84%	84%	84%	83%	84%	84%	ID

Tabulka XI. Procentuální sekvenční identita nukleotidů genu CP u izolátů ASGV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

nt	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10 Ind	iso 11 Ind	iso 12 Chi	iso 13 Chi
iso 1	ID	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	91%	91%
iso 2	99%	ID	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	99%	91%	91%
iso 3	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	91%	91%
iso 4	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	92%	91%
iso 5	99%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%	99%	91%	91%
iso 6	99%	99%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%	91%	91%
iso 7	99%	98%	99%	99%	99%	99%	ID	99%	98%	99%	99%	91%	91%
iso 8	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	91%	91%
iso 9	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	ID	99%	99%	92%	92%
iso 10 Ind	99%	98%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	ID	99%	91%	91%
iso 11 Ind	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	ID	91%	91%
iso 12 Chi	91%	91%	91%	92%	91%	91%	91%	91%	92%	91%	91%	ID	100%
iso 13 Chi	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	92%	91%	91%	100%	ID

Tabulka XII. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin genu CP u izolátů ASGV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

aa	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10 Ind	iso 11 Ind	iso 12 Chi	iso 13 Chi
iso 1	ID	99%	99%	99%	100%	100%	98%	100%	100%	99%	100%	97%	97%
iso 2	99%	ID	99%	99%	100%	100%	98%	100%	100%	99%	100%	97%	97%
iso 3	99%	99%	ID	99%	100%	100%	98%	100%	100%	99%	100%	97%	97%
iso 4	99%	99%	99%	ID	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	97%	97%
iso 5	100%	100%	100%	100%	ID	100%	98%	100%	100%	99%	100%	98%	98%
iso 6	100%	100%	100%	100%	100%	ID	98%	100%	100%	99%	100%	98%	98%
iso 7	98%	98%	98%	99%	98%	98%	ID	98%	98%	97%	98%	96%	96%
iso 8	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	ID	100%	99%	100%	98%	98%
iso 9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%	ID	99%	100%	98%	98%
iso 10 Ind	99%	99%	99%	99%	99%	99%	97%	99%	99%	ID	99%	97%	97%
iso 11 Ind	100%	100%	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	99%	ID	98%	98%
iso 12 Chi	97%	97%	97%	97%	98%	98%	96%	98%	98%	97%	98%	ID	100%
iso 13 Chi	97%	97%	97%	97%	98%	98%	96%	98%	98%	97%	98%	100%	ID

Tabulka XIII. Procentuální sekvenční identita nukleotidů parciálního genu CP u izolátů ASPV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

nt	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10 Pol	iso 11 Chi	iso 12 Kor	iso 13 Chi
iso 1	ID	76%	76%	78%	76%	78%	73%	76%	78%	71%	73%	71%	69%
iso 2	76%	ID	94%	87%	96%	87%	75%	77%	79%	74%	74%	74%	73%
iso 3	76%	94%	ID	86%	96%	87%	74%	75%	78%	73%	76%	73%	72%
iso 4	78%	87%	86%	ID	87%	88%	76%	78%	80%	77%	74%	77%	73%
iso 5	76%	96%	96%	87%	ID	87%	74%	77%	80%	74%	75%	75%	73%
iso 6	78%	87%	87%	88%	87%	ID	77%	76%	80%	75%	75%	75%	73%
iso 7	73%	75%	74%	76%	74%	77%	ID	77%	76%	80%	71%	81%	77%
iso 8	76%	77%	75%	78%	77%	76%	77%	ID	76%	75%	73%	76%	76%
iso 9	78%	79%	78%	80%	80%	80%	76%	76%	ID	74%	75%	75%	74%
iso 10 Pol	71%	74%	73%	77%	74%	75%	80%	75%	74%	ID	73%	91%	82%
iso 11 Chi	73%	74%	76%	74%	75%	75%	71%	73%	75%	73%	ID	73%	74%
iso 12 Kor	71%	74%	73%	77%	75%	75%	81%	76%	75%	91%	73%	ID	78%
iso 13 Chi	69%	73%	72%	73%	73%	73%	77%	76%	74%	82%	74%	78%	ID

Tabulka XIV. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin parciálního genu CP u izolátů ASPV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

aa	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9	iso 10 Pol	iso 11 Chi	iso 12 Kor	iso 13 Chi
iso 1	ID	80%	79%	81%	80%	83%	82%	80%	87%	75%	74%	78%	74%
iso 2	80%	ID	95%	86%	98%	88%	78%	82%	86%	75%	78%	78%	73%
iso 3	79%	95%	ID	86%	96%	87%	77%	79%	84%	74%	81%	76%	70%
iso 4	81%	86%	86%	ID	87%	92%	81%	86%	86%	80%	86%	83%	77%
iso 5	80%	98%	96%	87%	ID	88%	78%	81%	86%	75%	79%	78%	73%
iso 6	83%	88%	87%	92%	88%	ID	83%	84%	88%	80%	83%	82%	75%
iso 7	82%	78%	77%	81%	78%	83%	ID	81%	87%	85%	76%	88%	79%
iso 8	80%	82%	79%	86%	81%	84%	81%	ID	84%	80%	80%	83%	79%
iso 9	87%	86%	84%	86%	86%	88%	87%	84%	ID	82%	79%	84%	79%
iso 10 Pol	75%	75%	74%	80%	75%	80%	85%	80%	82%	ID	79%	94%	83%
iso 11 Chi	74%	78%	81%	86%	79%	83%	76%	80%	79%	79%	ID	82%	77%
iso 12 Kor	78%	78%	76%	83%	78%	82%	88%	83%	84%	94%	82%	ID	86%
iso 13 Chi	74%	73%	70%	77%	73%	75%	79%	79%	79%	83%	77%	86%	ID

Tabulka XV. Procentuální sekvenční identita nukleotidů parciálního genu CP u izolátů ACLSV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

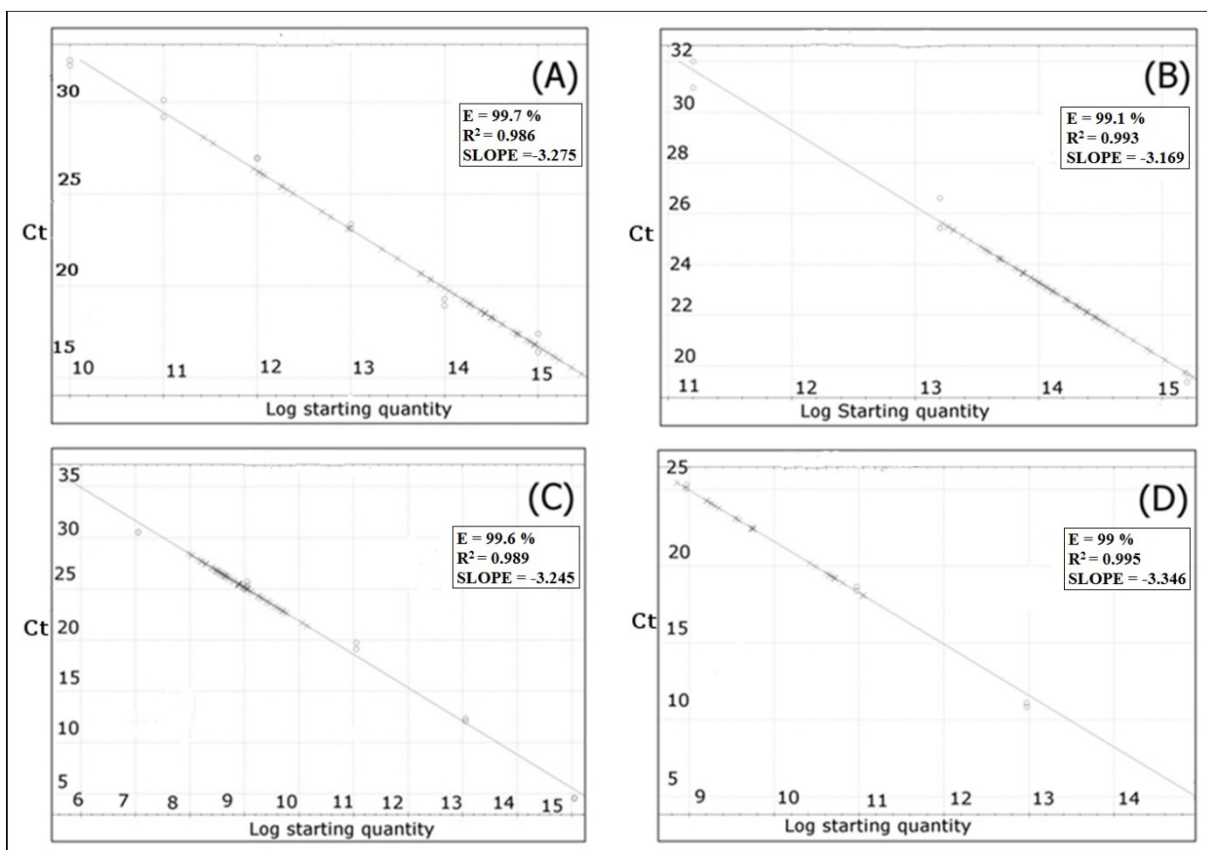
nt	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9 Ita	iso 10 Tur	iso 11 Chi	iso 12 Alb	iso 13 Can
iso 1	ID	83%	81%	82%	90%	94%	81%	82%	82%	93%	83%	80%	87%
iso 2	83%	ID	87%	86%	83%	83%	86%	86%	87%	83%	86%	87%	82%
iso 3	81%	87%	ID	91%	82%	81%	93%	91%	92%	81%	90%	92%	82%
iso 4	82%	86%	91%	ID	82%	82%	92%	92%	91%	82%	91%	91%	81%
iso 5	90%	83%	82%	82%	ID	93%	82%	82%	81%	91%	84%	82%	86%
iso 6	94%	83%	81%	82%	93%	ID	81%	82%	81%	95%	83%	80%	87%
iso 7	81%	86%	93%	92%	82%	81%	ID	94%	93%	81%	91%	93%	81%
iso 8	82%	86%	91%	92%	82%	82%	94%	ID	94%	82%	93%	93%	82%
iso 9 Ita	82%	87%	92%	91%	81%	81%	93%	94%	ID	82%	92%	94%	82%
iso 10 Tur	93%	83%	81%	82%	91%	95%	81%	82%	82%	ID	82%	81%	86%
iso 11 Chi	83%	86%	90%	91%	84%	83%	91%	93%	92%	82%	ID	91%	82%
iso 12 Alb	80%	87%	92%	91%	82%	80%	93%	93%	94%	81%	91%	ID	81%
iso 13 Can	87%	82%	82%	81%	86%	87%	81%	82%	82%	86%	82%	81%	ID

Tabulka XVI. Procentuální sekvenční identita odvozených aminokyselin parciálního genu CP u izolátů ACLSV. Vybrané izoláty jsou uvedeny v tab. 7.

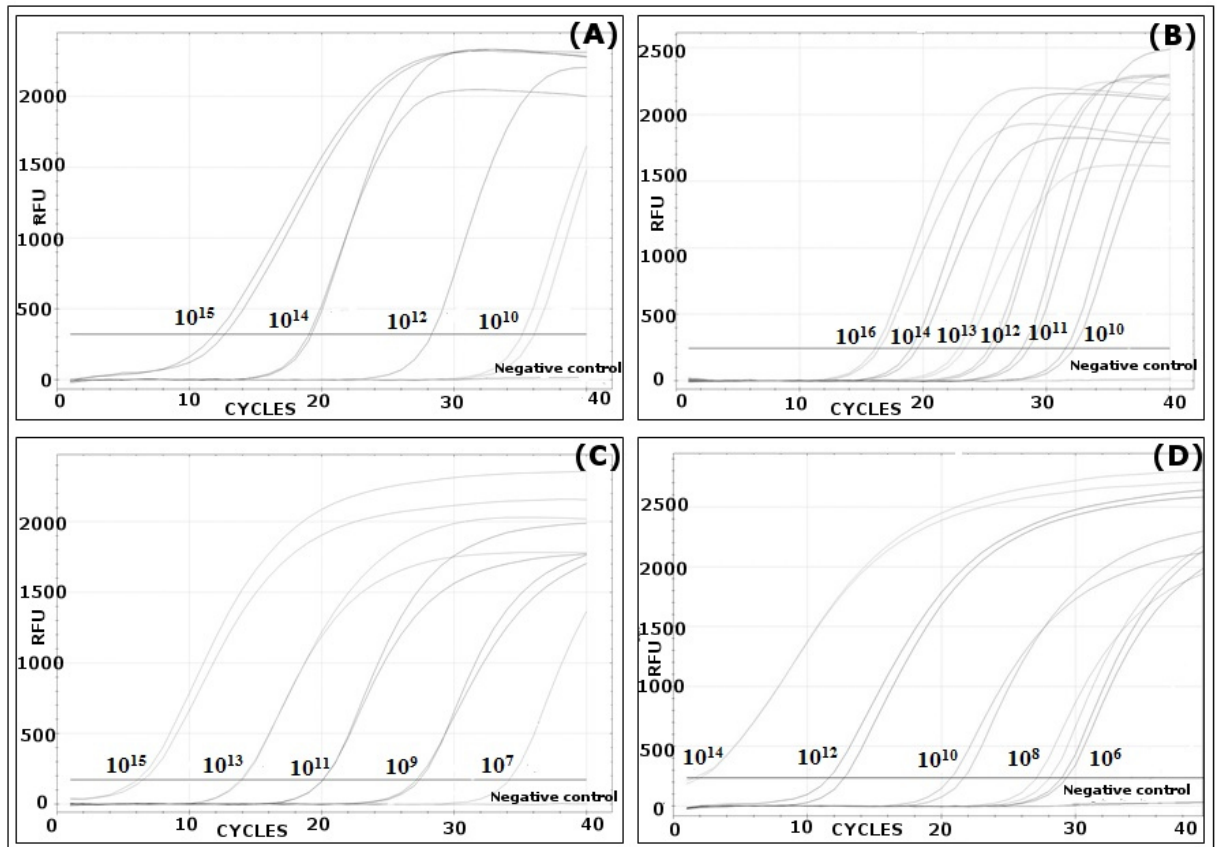
aa	iso 1	iso 2	iso 3	iso 4	iso 5	iso 6	iso 7	iso 8	iso 9 Ita	iso 10 Tur	iso 11 Chi	iso 12 Alb	iso 13 Can
iso 1	ID	94%	93%	91%	98%	98%	91%	92%	91%	98%	92%	91%	98%
iso 2	94%	ID	98%	93%	92%	92%	95%	95%	96%	91%	95%	96%	92%
iso 3	93%	98%	ID	95%	93%	93%	97%	98%	98%	92%	98%	98%	93%
iso 4	91%	93%	95%	ID	91%	91%	95%	96%	94%	90%	96%	95%	91%
iso 5	98%	92%	93%	91%	ID	98%	91%	92%	91%	98%	92%	91%	98%
iso 6	98%	92%	93%	91%	98%	ID	91%	92%	91%	99%	92%	91%	98%
iso 7	91%	95%	97%	95%	91%	91%	ID	99%	97%	91%	98%	96%	91%
iso 8	92%	95%	98%	96%	92%	92%	99%	ID	98%	91%	98%	97%	92%
iso 9 Ita	91%	96%	98%	94%	91%	91%	97%	98%	ID	91%	96%	97%	91%
iso 10 Tur	98%	91%	92%	90%	98%	99%	91%	91%	91%	ID	91%	91%	98%
iso 11 Chi	92%	95%	98%	96%	92%	92%	98%	98%	96%	91%	ID	97%	92%
iso 12 Alb	91%	96%	98%	95%	91%	91%	96%	97%	97%	91%	97%	ID	91%
iso 13 Can	98%	92%	93%	91%	98%	98%	91%	92%	91%	98%	92%	91%	ID

Obrázky**Obrázek I. Výsledné grafy při absolutní kvantifikaci ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV metodou qRT-PCR.**

(A): ApMV, (B): ASGV, (C): ASPV a (D): ACLSV. (x) jednotlivé vzorky; (o) standardy; (-) standardní křivka; Ct (cycle of treshold) - cyklus prahu.



Obrázek II. Optimalizované standardní křivky pro qRT-PCR. (A): standardní křivka ApMV v rozsahu 10^{10} - 10^{15} ; (B): standardní křivka ASGV v rozsahu 10^{10} - 10^{16} ; (C): standardní křivka ASPV v rozsahu 10^7 - 10^{15} ; (D): standardní křivka ACLSV v rozsahu 10^6 - 10^{14} . RFU (relative fluorescence unit) – relativní fluorescenční jednotka.



Obrázek III. Křivky tání pro qRT-PCR. Hodnoty křivek tání odpovídají specificky délce fragmentů při amplifikaci (A): ApMV; (B): ASGV; (C): ASPV; (D): ACLSV specifickými primery (tab. 3) při qRT-PCR reakci.

