

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Jakub Lemberk

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně genetická charakteristika
izolátu LChV1 infikujícího mandloň
obecnou**

Bakalářská práce

Jakub Lemberk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jakub LEMBERK**
Osobní číslo: **R18650**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Molekulárně genetická charakteristika izolátu LChV1 infikujícího mandloň obecnou**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše shrnující aktuální poznatky o little cherry virus 1 s důrazem na molekulárně-genetickou variabilitu známých izolátů infikujících různé hostitele r. *Prunus*.
2. Zvládnutí technik vhodných pro molekulárně genetickou analýzu ss(+)RNA virů: Izolace nukleových kyselin, RT-PCR, konvenční Sangerovo sekvenování, bioinformatická analýza sekvenčních dat.
3. Charakterizace izolátu viru infikujícího mandloň pomocí RT-PCR a Sangerova sekvenování.
4. Analýza získané genomické sekvence atypického mandloňového izolátu a jeho srovnání se známými izoláty LChV1 viru, vyhodnocení genetické variability na úrovni kompletní sekvence a jednotlivých ORF, fylogenetické analýza.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Katsiani, A., Maliogka, V. I., Katis, N., Svanella-Dumas, L., Olmos, A., et al. (2018): High-Throughput Sequencing Reveals Further Diversity of Little Cherry Virus 1 with Implications for Diagnostics. *Viruses* 10, 385.

Jiawei Wang, Dongzi Zhu, Yue Tan, Xiaojuan Zong, Hairong Wei, Rosemarie W. Hammond & Qingzhong Liu (2016): Complete nucleotide sequence of little cherry virus 1 (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology* 161, 749-753.

Katsiani, A. T., Maliogka, V. I., Amoutzias, G. D., Efthimiou, K. E., Katis, N. I. (2014): Insights into the genetic diversity and evolution of *Little cherry virus 1*. *Plant Pathology* 64, 817-824.

Matic, S., Myrta, A., Minafra, A. (2007): First report of little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Plant Pathology* 89, 75.

Jelkmann, W., Fechtner, B., Agranovsky, A. A. (1997): Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology* 78, 2067-2071.

Jelkmann, W., Vitushkina, M., Fechtner, B., Agranovsky, A. (1997): Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 103, 803-808.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: **15. dubna 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2021**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901

-2-

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Jakub Lemberk

Název práce: Molekulárně genetická charakteristika izolátu LChV1 infikujícího mandloň obecnou

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: little cherry virus 1, genetická variabilita, Sangerovo sekvenování, fylogeneze, *Velarivirus*

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: český

ABSTRAKT

Little cherry virus 1 (LChV1) z čeledi *Closteroviridae* je patogen dřevin rodu *Prunus*, u kterých je jedním z původců choroby zvané little cherry disease. Virus je rozšířený po celém světě a jednotlivé izoláty mezi sebou vykazují vysokou variabilitu. Tato bakalářská práce se zaměřila na molekulárně genetickou charakteristiku LChV1 izolátu Alm138, který byl získán z mandloně obecné (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) vykazující příznaky little cherry disease. Získaná celogenomová sekvence LChV1 izolátu byla 16 928 nt dlouhá a obsahovala 8 otevřených čtecích rámců, které byly v souladu se strukturou genomu tohoto viru. Porovnáním této sekvence s genomy dostupnými v databázi GenBank vykazoval izolát Alm138 nejvyšší identitu v nukleotidové sekvenci, 96,2 %, 92,1 % a 91,9 %, s izoláty Apr184R (Acc. No. MN242219), Kyoto-2 (MG934545) a BJ (MK775591). Příbuznost těchto izolátů potvrdila fylogenetická analýza genomové sekvence a genů pro RdRp, HSP70h a CP, která izolát Alm138 zařadila do již dříve popsané fylogenetické skupiny G5, společně s LChV1 izoláty Apr184R, Kyoto-2, BJ a LV27S2 (LC523023).

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Jakub Lemberk

Title: Molecular genetic characteristic of LChV1 isolate infecting almond, *Prunus dulcis*

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: little cherry virus 1, genetic diversity, Sanger sequencing, phylogeny, *Velarivirus*

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

Little cherry virus 1 (LChV1) from a family *Closteroviridae* is a pathogen of *Prunus* species in which he is one of a causal agents of little cherry disease. LChV1 is a widespread virus and its isolates exhibit high genetic diversity. This bachelor thesis focuses on molecular genetic characteristic of LChV1 isolate Alm138 infecting almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) that was showing symptoms of little cherry disease. The LChV1 Alm138 genome sequence obtained was 16 928 nt in length and it contained eight open reading frames, which were consistent with the genome structure of this virus. Comparing this sequence with genomes available in GenBank database showed highest identity at the complete genome level of 96,2 %, 92,1 % and 91,9 % with LChV1 isolates Apr184R (Acc. No. MN242219), Kyoto-2 (MG934545) and BJ (MK775591). Close relation of these isolates was confirmed by phylogenic analysis of genome sequence and genes coding RdRp, HSP70h and CP, which grouped Alm138 isolate into described phylogenic group G5 together with LChV1 isolates Apr184R, Kyoto-2, BJ and LV27S2 (LC523023).

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Jakub Lemberk

Poděkování:

Rád bych poděkoval Mgr. Daně Šafářové, PhD. za její odborné a trpělivé vedení při psaní bakalářské práce, za její ochotu a cenné rady při práci v laboratoři a za její čas, který u této práce strávila.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Little cherry disease	3
3.2	Taxonomické zařazení LChV1	4
3.3	Biologické vlastnosti a rozšíření LChV1	5
3.4	Morfologie LChV1.....	6
3.5	Organizace genomu LChV1	7
3.6	Detekce LChV1	11
3.7	Genetická variabilita LChV1	12
4	MATERIÁL A METODY	14
4.1	Biologický materiál.....	14
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	14
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	15
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	16
4.4.1	Izolace RNA	16
4.4.2	Reverzní transkripce	17
4.4.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
4.4.4	Elektroforetická separace.....	20
4.4.5	Izolace PCR produktu z gelu	21
4.4.6	Sekvenační značení.....	22
4.4.7	Bioinformatická analýza	22
5	VÝSLEDKY.....	24
5.1	Detekce a amplifikace specifických genomických úseků LChV1	24
5.2	Molekulárně genetická charakteristika izolátu Alm138	26
5.3	Fylogenetická analýza.....	31
6	DISKUSE	37
7	ZÁVĚR.....	41
8	LITERATURA	42

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Acc. No.	‘Accession number’, přístupové číslo v databázi GenBank
BLASTN	‘Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool’
cDNA	komplementární DNA
CoV1	<i>Cordyline virus 1</i>
CP	plášťový protein
CPm	plášťový protein minor
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
ELISA	‘Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay’
GLRaV7	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i>
HEL	helikáza
HSP70	‘heatshock’ protein 70
HSP70h	homolog ‘heatshock’ proteinu 70
HSP90	‘heatshock’ protein 90
LChD	‘Little cherry disease’, maloplodost třešně a višně
LChV1	<i>Little cherry virus 1</i>
LChV2	<i>Little cherry virus 2</i>
PLP	‘papain-like’ proteáza
mRNA	mediátorová RNA
MET	metyltransferáza
NGS	sekvenování nové generace
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
PřF	Přírodovědecká fakulta
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná PCR
(+)ssRNA	jednovláknová lineární pozitivně orientovaná RNA
tRNA	transferová RNA
UTR	nepřekládaná oblast

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schematická struktura virionu *Closteroviridae*.

Obrázek 2: Schematická struktura genomu LChV1.

Obrázek 3: Detekce little cherry virus 1 pomocí primerů (A) podle Rott *et al.* (2001) a (B) primerů podle Glasa *et al.* (2015).

Obrázek 4: Amplifikace specifických genomických úseků little cherry virus 1 pomocí specifických primerů.

Obrázek 5: Genomická mapa LChV1 izolátu Alm138 s vyznačenými ORF a místy nasedání amplifikačních primerů.

Obrázek 6: SDTv1.2 analýza identity kompletních genomových sekvencí LChV1 izolátů.

Obrázek 7: Fylogenetický strom genomových sekvencí LChV1 izolátů konstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0).

Obrázek 8: Fylogenetický strom ORF 1a/b aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0).

Obrázek 9: Fylogenetický strom ORF 3 aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0).

Obrázek 10: Fylogenetický strom ORF 5 aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0).

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení reakční směsi I a II pro reverzní transkripci.

Tabulka 2: Seznam použitých detekčních primerů.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi (na jeden test).

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace.

Tabulka 5: Příprava PCR reakční směsi.

Tabulka 6: Podmínky PCR amplifikace.

Tabulka 7: Seznam použitých primerů.

Tabulka 8: Seznam primerů použitých k sekvenačnímu značení vnitřních úseků.

Tabulka 9: Podmínky sekvenačního značení.

Tabulka 10: Charakteristika jednotlivých otevřených čtecích rámců LChV1 izolátu Alm138.

Tabulka 11: Porovnání identity izolátu Alm138 s LChV1 izoláty dostupnými v databázi GenBank.

Tabulka 12: Charakteristika LChV1 izolátů použitých ve fylogenetické analýze.

1 ÚVOD

RNA viry patří mezi významné patogeny ovocných dřevin, které každoročně způsobují na celém světě výrazný pokles ve výnosech plodů a negativně tak ovlivňují hospodářskou produkci. Významnou virovou chorobou peckovin rodu *Prunus* je maloplodost třešní a višní (little cherry disease), která je způsobena infekcí viry *Little cherry virus 1* a *2* a Western X-disease fytoplazmou. Choroba se nejintenzivněji projevuje u třešní a višní, u nichž byla i původně identifikována. Její projevy jsou znatelné především na plodech a listech, které jsou malé, svraštělé a bez chuti, a proto jsou tržně zcela nepoužitelné. *Little cherry virus 1* a *2* náleží do čeledi *Closteroviridae* (+)ssRNA virů, ale příslušejí do odlišných rodů. Ačkoliv byl původce této choroby původně identifikován pouze u třešně obecné a višně obecné, v uplynulých patnácti letech byla prokázána infekce také dalších hostitelů rodu *Prunus*, např. mandloně obecné, meruňky obecné, broskvoně obecné nebo slivoně švestky. Studie little cherry virus 1 izolátů ukazují značnou genetickou variabilitu. Z epidemiologického hlediska je klíčové tyto izoláty dále detailně studovat s cílem tomuto viru a jeho epidemiologii lépe porozumět.

2 CÍLE PRÁCE

- 1 Vypracování literární rešerše shrnující aktuální poznatky o *Little cherry virus 1* s důrazem na molekulárně-genetickou variabilitu známých izolátů infikujících různé hostitele r. *Prunus*.
- 2 Zvládnutí technik vhodných pro molekulárně genetickou analýzu ss(+)RNA virů: Izolace nukleových kyselin, RT-PCR, konvenční Sangerovo sekvenování, bioinformatická analýza sekvenčních dat.
- 3 Charakterizace izolátu viru infikujícího mandloň pomocí RT-PCR a Sangerova sekvenování.
- 4 Analýza získané genomické sekvence atypického mandloňového izolátu a jeho srovnání se známými izoláty LChV1 viru, vyhodnocení genetické variability na úrovni kompletní sekvence a jednotlivých ORF, fylogenetická analýza.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Little cherry disease

Maloplodost třešní a višní, little cherry disease (LChD), je závažná choroba infikující zástupce rodu *Prunus*. LChD byla poprvé pozorována u třešně obecné (*Prunus avium* (L.) L.) roku 1933 v třešňových sadech v Kootenay Valley v kanadské provincii Britská Kolumbie (Foster *et* Lott, 1947). Během 15 let zde došlo k infekci téměř všech třešní a v důsledku toho v průběhu dalších 30-ti let (1949–1979) klesla produkce plodů až o 90 %, z 680 tun vyprodukovaných plodů ročně na 68 tun. LChD měla negativní dopad na produkci třešní i na západě USA ve státě Washington a závažná epidemiologická situace byla i v devadesátých letech minulého století v Evropě v Německu (Welsch, 1976; Slykhuis *et al.*, 1980; Büttner *et al.*, 1994; Bajet *et al.*, 2008).

Nejsilnější symptomy LChD lze pozorovat u okrasných či hospodářských třešní a višní. U infikovaných stromů jsou patrné malé, špičaté, nedokonale zbarvené plody, které postrádají sladkou a kyselou chuť a nedozrávají. Na konci léta se svrchní část listů barví do červena až bronzova, žilky si zachovávají zelenou barvu, a vytváří se tak chlorotická mozaika. Příznaky LChD se objevují u kultivarů s rozdílnou intenzitou. Nejnáchylnějšími kultivary jsou Lambert a Bing (Welsch, 1976; WSU Tree Fruit, 2021).

Little cherry disease je způsobena infekcí viry little cherry virus 1 (LChV1) a little cherry virus 2 (LChV2), které se mohou v hostiteli vyskytovat individuálně, nebo společně, a Western X-disease fytoplazmou. Patogeny LChV2 a Western X-disease fytoplazma vyvolávají u hostitele silné symptomy, které si jsou navzájem velmi podobné a dříve od sebe nebyly odlišovány. Oproti tomu LChV1 sám o sobě nevyvolává žádné nebo mírné příznaky, v hostiteli je tak v latentní fázi. Ve smíšené infekci ovšem může utlumovat nepříznivý účinek LChV2. Asymptotické stromy představují riziko v podobě nevědomého šíření tohoto patogenu na další hostitele (Matic *et al.*, 2009a; Schroeder *et* Petruschke, 2009; Candresse *et al.*, 2013; Glasa *et al.*, 2015; Katsiani *et al.*, 2015, 2018b; WSU Tree Fruit, 2021).

LChV1, LChV2 i Western X-disease fytoplazma jsou z infikované rostliny přenosné vegetativně roubováním, little cherry virus 2 a Western X-disease fytoplazma jsou přenosné i hmyzem. U LChV2 se jedná o hmyz z čeledi červcovití (*Pseudococcidae*),

kam patří např. červec javorový (*Phenacoccus aceris*) nebo *Pseudococcus maritimus*, u Western X-disease fytoplazmy je to hmyz z čeledi křískovití (*Cicadellidae*), např. *Colladonus montanus* nebo *Euscelidius variegatus*. Eliminace hmyzích vektorů v napadené oblasti je klíčová a obvykle se jedná o první nutný krok ve snaze o zabránění šíření patogenu. V současné době není znám přirozený vektor LChV1. V kontrolovaných podmínkách skleníku se však podařilo z infikované třešně obecně přenést LChV1 na bylinu *Nicotiana occidentalis* pomocí parazitické kokotice evropské (*Cuscuta europaea*), která sloužila jako vektor. Po 6 měsících vykazovala původně zdravá *Nicotiana occidentalis* zakrnělý růst a měla zatočené listy se zarudlými okraji a žilkami. Přítomnost LChV1 byla následně potvrzena pomocí RT-PCR. Pokusy o šíření LChV1 mezi hostiteli mechanickým přenosem, případně pomocí semen, nebyly úspěšné. Touto cestou tedy virus s největší pravděpodobností šířitelný není (Jensen, 1969; Raine *et al.*, 1986; Jelkmann *et al.*, 2010; Mekuria *et al.*, 2013; Fuchs *et al.*, 2020; WSU Tree Fruit, 2021).

3.2 Taxonomické zařazení LChV1

LChV1 se řadí do čeledi virů *Closteroviridae*, kam patří 56 virových druhů, napadajících celou škálu hospodářských či okrasných rostlin, např. citrusy, brambory, salát, třešně aj. Morfologie virových částic zástupců této čeledi byla inspirací pro její jméno, které je odvozené z řeckého slova *kloster* a překládá se jako vlákno či niť. Čeleď byla ustanovena na virologickém kongresu roku 1996 a dnes zahrnuje 4 rody: *Closterovirus*, *Crinivirus*, *Ampelovirus* a *Velarivirus*. Do jednotlivých rodů jsou viry rozřazovány na základě stanovených kritérií, kterými jsou: délka virionu, počet a organizace otevřených čtecích rámců, fylogenetická analýza genů pro RNA-dependentní RNA polymerázu, HSP70h a plášťového proteinu, počet genomových RNA a existence, příp. druh vektora. LChV1 nebyl do roku 2012 taxonomicky ukotven v žádném rodu, kdy byl na základě molekulárně biologických odlišností od ostatních virů této čeledi zařazen do nově vytvořeného rodu *Velarivirus* spolu s *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV7) a *Cordyline virus 1* (CoV1). Jméno rodu je odvozeno z latinského slova *velare*, což znamená „skrytý“ nebo „zahalený“, viry patřící do tohoto rodu nezpůsobují při infekci svého přirozeného hostitele žádné zjevné příznaky choroby. Dnes do tohoto rodu patří 7 virových druhů; mimo uvedených LChV1, GLRaV7 a CoV1 také *Cordyline virus 2*, *Cordyline virus 3*, *Cordyline virus 4* a *Areca palm velarivirus 1*. Druhý virus asociovaný

s LChD, *Little cherry virus 2*, se řadí do téže čeledi, ale do rodu *Ampelovirus* (Pringle, 1996; Jelkmann *et al.*, 2012; Martelli *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2020).

3.3 Biologické vlastnosti a rozšíření LChV1

Little cherry virus 1 byl poprvé popsán v Německu v důsledku zkoumání maloplodosti třešní a višní a byl označen za původce této choroby (Keim-Konrad *et al.*, 1996). Původně se věřilo, že okruh hostitelů LChV1 není nijak velký a zahrnuje pouze třešeň obecnou a višeň obecnou, novější studie ovšem prokázaly, že tento virus ve skutečnosti infikuje také jiné zástupce rodu *Prunus*, např. slivoň švestku (*Prunus domestica* L.), broskvoň obecnou (*Prunus persica* (L.) Batsch), mandloň obecnou (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) nebo sakuru ozdobnou (*Prunus serrulata* Lindl.) (Matic *et al.*, 2007, 2009a; Candresse *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2015; Katsiani *et al.*, 2018b). V nedávné době byl hostitelský okruh rozšířen i o meruňku obecnou (*Prunus armeniaca* (L.) L.) (Šafářová *et al.*, 2017a).

Jak již bylo zmíněno dříve, u hostitelských rostlin LChV1 většinou nevyvolává žádné příznaky LChD, v roce 2020 byla ovšem zaznamenána infikovaná mandloň obecná s chlorotickými mozaikami na listech typickými pro LChD (Šafářová *et al.*, 2020) a u sakury ozdobné byl LChV1 identifikován jako původce dalších chorob, konkrétně 'Kwanzan stunting syndrome' a 'Shirofugen stunt disease'. Infikované sakury vykazovaly opožděný vývoj pupenů, malý vzrůst a deformaci listů i celé rostliny, sníženou vitalitu rostlin, nekrózu cévních svazků a infekce obvykle končila úhynem celé rostliny po několika vegetačních cyklech (Matic *et al.*, 2009a; Candresse *et al.*, 2013).

Pro LChV1 je typický tkáňově specifický tropismus. Jeho výskyt a replikace je omezena na sítkovici, floémový parenchym a doprovodné buňky. Po infekci dochází ve floému ke vzniku specifických cytoplazmatických agregátů virových částic, které se prolínají s membránovými váčky odvozenými z endoplazmatického retikula, případně z mitochondrií. Koncentrace virových částic ve floému infikované rostliny není v průběhu roku konstantní, ale kolísá. Největší koncentrace byla naměřena na začátku jara, v dubnu, v nově vyrostlých větvích a listech. Přes léto hladina částic střídavě klesala a stoupala, rapidní pokles nastal začátkem zimy a trval až do února (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Katsiani *et al.*, 2018b; Fuchs *et al.*, 2020).

Díky obchodu s okrasnými třešněmi, ve kterých může být LChV1 v latentní formě, se virus v infikovaném rostlinném materiálu může šířit až na velké vzdálenosti (Jelkmann *et al.*, 2011; Jeger *et al.*, 2017). Dnes je little cherry virus 1 rozšířený téměř po celém světě. Byl zaznamenán v Evropě v Belgii (Tahzima *et al.*, 2017), České republice (Ludvíková *et al.*, 2011), Francii (Marais *et al.*, 2016), Maďarsku (Baráth *et al.*, 2018), Německu (Keim-Konrad *et al.*, 1996), Polsku (Komorowska *et al.*, 2004), Rumunsku (Zagrai *et al.*, 2018), Řecku (Elena *et al.*, 2008), Slovensku (Glasa *et al.*, 2015), Španělsku (Ruiz-Garcia *et al.*, 2016), Itálii (Matic *et al.*, 2007), ale i ve Švýcarsku, Nizozemsku a Velké Británii (Vitushkina *et al.*, 1997). V Asii byl detekován v Japonsku (Isogai *et al.*, 2004), Číně (Wang *et al.*, 2016), Jižní Koreji (Lim *et al.*, 2015), Turecku (Serce *et al.*, 2011) a Indii (Nagar *et al.*, 2009). Objevil se ale i v Chile (Fiore *et al.*, 2018), USA (Sabanadzovic *et al.*, 2005) nebo na Novém Zélandu (Fry *et al.*, 1970). Nedávno byl LChV1 poprvé detekován také v Austrálii (Kinoti *et al.*, 2020) a v Africe v Maroku (Tahzima *et al.*, 2019).

3.4 Morfologie LChV1

Morfologie virionu *Little cherry virus 1* odpovídá obecnému popisu virionů zástupců čeledi *Closteroviridae*, od zástupců jiných rodů se morfologicky liší převážně délkou virionu a velikostí genomu. Virion zástupců čeledi *Closteroviridae* dosahuje délky 650–2 200 nm a velikost genomu se pohybuje v rozmezí 13 000–20 000 nukleotidů. V porovnání s ostatními RNA fytoviry je genom přímo „obří“. Obecně mezi pozitivními RNA viry se closterovirům mohou velikostí genomu rovnat pouze zvířecí koronaviry a toroviry (Agranovsky, 1996; Fuchs *et al.*, 2020).

LChV1 viriony představují neobalená, spirálovitě konstruovaná vlákna, která jsou dlouhá 1 500–1 700 nm. Ve floému infikovaného materiálu se v elektronovém mikroskopu jeví jako šestihranné, vláknité částice široké 12 nm. Obsahují jedinou monopartitní lineární pozitivně orientovanou jednovláknovou molekulu RNA, která tvoří 5–6 % celkové hmotnosti částice. Tělo virionu je tvořeno dvěma typy plášťového proteinu, hlavním plášťovým proteinem (CP) a vedlejším 'minor' plášťovým proteinem (CPm). CP tvoří téměř celé tělo virionu a chrání genomovou RNA. Na jednu otočku RNA šroubovice připadá asi 10 proteinových podjednotek CP, které molekulu RNA obtáčí a zapouzdřují, středový prostor s RNA je 3–4 nm široký (viz obrázek 1). CPm na 5'-konci RNA

zapouzdřuje oblast velikou asi 600–700 nukleotidů a vytváří tak 75–100 nm dlouhý útvar, který dostal označení ocas (z anglického 'tail'). Díky tomu připomínají viry z čeledi *Closteroviridae* v elektronovém mikroskopu chřestýše (z angl. 'rattlesnake') a často jsou tímto slovem i označováni. CPM slouží k mezibuněčnému pohybu viru (Dolja *et al.*, 1994; Keim-Konrad *et al.*, 1996; Karasev, 2000; Alzhanova *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 2009a; Agranovsky, 2016; Fuchs *et al.*, 2020).

V prostředí s vysokou koncentrací solí je virion nestabilní, je však rezistentní vůči organickým rozpouštědlům. Virion není schopný virovou RNA ochránit před působením RNás, chelatačních činidel a vysokých teplot. K inaktivaci viru dochází při teplotách okolo 45–55 °C (Fuchs *et al.*, 2020).

Genom LChV1 je veliký 16–17 kb, izolátem LChV1 s nejdelším genomem je nově popsán australský izolát LV16 (Acc. No. LC523021) o délce 16 975 nukleotidů (Kinoti *et al.*, 2020). Na 3'-konci RNA nedochází k polyadenylaci a není zde ani žádná struktura podobná tRNA. Vytváří se zde několik vlásenek a tzv. pseudouzlů, které formují 'cis-acting' RNA struktury. Tyto struktury hrají nepostradatelnou úlohu při virové replikaci nebo při ribosomálním sklouznutí ('frameshift'). Na 5'-konci RNA vlákna se vytváří methyl guanosinová čepička (Agranovsky, 2016; Fuchs *et al.*, 2020).



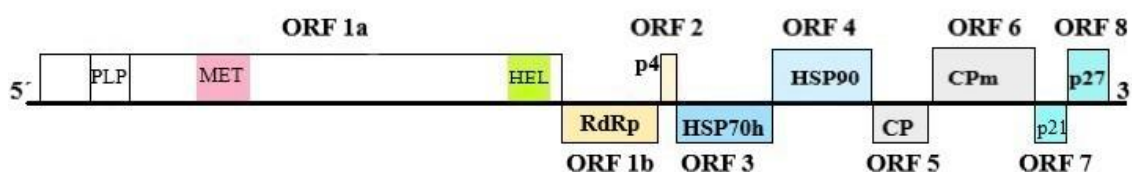
Obrázek 1: Schematická struktura virionu *Closteroviridae* (zdroj: ViralZone, 2021).

3.5 Organizace genomu LChV1

Monopartitní genom LChV1 je tvořen lineární ss(+)RNA, která má osm otevřených čtecích rámců (ORF) a kóduje deset proteinů, genom je schematicky znázorněn na obrázku 2. Struktura genomu LChV1 byla poprvé popsána u německého izolátu UW2 (Acc. No. NC_001836), který se roku 1997 stal prvním sekvenovaným izolátem little

cherry virus 1 na světě, a organizací genomu se od ostatních izolátů LChV1 příliš neliší (Keim-Konrad *et Jelkmann*, 1996; Jelkmann *et al.*, 1997).

Genom izolátu UW2 dosahuje velikosti 16 934 nukleotidů. 5' a 3' nepřekládané oblasti (UTR) jsou dlouhé 76 a 206 nukleotidů. První čtecí rámec ORF 1 se dělí na 1a a 1b. ORF 1a začíná iniciačním kodónem AUG v pozici 77 nt a je ukončen stop kodonem UGA v pozici 6 981. Kóduje 2 301 aminokyselin dlouhý polypeptid se specifickými doménami pro 'papain-like' proteázu (PLP), methyltransferázu (MET) a RNA helikázu (HEL). Methyltransferáza metylací RNA na 5' konci vytváří methyl guanosinovou čepičku. ORF 1b začíná v pozici 6 951 nt a o deset tripletů se překrývá s koncem ORF 1a, končí v pozici 8 498 stop kodónem UAA. Kóduje 515 aminokyselin dlouhý protein obsahující konzervativní doménu pro RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). K expresi ORF 1b dochází pouze v případě 0/+1 posunu/sklouznutí ('frameshiftu') ribozomu při translaci v místě ORF 1a stop kodonu UGA o jeden nukleotid doprava, čímž „zmizí“ triplet, který by znamenal ukončení translace. Translační aparát původní sekvenci GUU_UGA_C přečte jako GUU_UGC_. Po translaci tedy vznikají dva polyproteiny, jeden s doménami pro PLP-MET-HEL a druhý, větší fúzní polyprotein o velikosti 2 807 aminokyselin, zahrnující domény PLP-MET-HEL-RdRp. Porovnáním frekvence vzniku polypeptidu 1a expresí ORF 1a s frekvencí vzniku fúzního polypeptidu 1ab vzniklého +1 frameshiftem bylo stanoveno, že k +1 posunu čtecího rámce dochází asi v 1 % translací. Ve většině případů se tedy fúzní protein nevytváří a RdRp se vytvoří výrazně méně než produktů ORF 1a (Rozanov *et al.*, 1992; Agranovsky *et al.*, 1994, 1996, 2016; Jelkmann *et al.*, 1997; Dolja *et al.*, 2006).



Obrázek 2: Schematická struktura genomu LChV1.

Legenda: (ORF): otevřený čtecí rámec, (PLP): papain-like proteáza, (MET): methyltransferáza, (HEL): helikáza, (RdRp): RNA-dependentní RNA polymeráza, (p4): hydrofobní protein p4, (HSP70h): homolog heat-shock proteinu 70, (HSP90): chaperonový protein o velikosti 61 kDa, (CP): plášťový protein, (CPm): minor plášťový protein, (p21): protein o velikosti 21 kDa, (p27): protein o velikosti 27 kDa.

Proteiny syntetizované ORF1a/b jsou asociovány s RNA replikací a jsou nezbytné pro její správný průběh. PLP navíc slouží i jako její zesilovač a eliminací PLP byla zaznamenána redukce v množství virové RNA o 99,9 % oproti viru s funkční papain-like proteázou. PLP svojí autoproteolytickou aktivitou štěpí na N-konci peptidickou vazbu mezi 588. a 589. aminokyselinou, čímž dojde k oddělení polypeptidu s doménami pro MET a HEL od PLP. Toto oddělení PLP (66 kDa) od polypeptidu MET-HEL je klíčovým krokem ke správné replikaci genomové RNA. Posttranslačními úpravami je polypeptid MET-HEL (případně MET-HEL-RdRp) štěpen až na jednotlivé proteiny, 63 kDa velký MET, 100 kDa velký HEL a případný 150 kDa velký fúzní protein HEL-RdRp. Není vyloučené, že se HEL-RdRp dále štěpí, v současné době to ale není prokázané. Jednotlivé proteiny PLP, MET a HEL se shlukují na membránách buněčných kompartmentů specifických pro closterovirovou infekci, což naznačuje, že zde vytváří na membránu připojený replikační aparát. Díky lokalizaci PLP blízko replikačního aparátu je pravděpodobné, že funkce PLP souvisí s aktivací virové replikázy, případně chrání virovou RNA před degradací hostitelským obranným mechanismem (Peremyslov *et al.*, 1998; Satyanarayana *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2000; Zinkovkin *et al.*, 2003; Dolja *et al.*, 2006).

Otevřené čtecí rámce lokalizované vpravo od 3' konce genu pro RNA-dependentní RNA polymerázu (ORF 1b) jsou exprimovány specifickými vnořenými subgenomickými mRNA, které se vytváří podle antiparalelního templátového vlákna virionu (Karasev *et al.*, 1997).

ORF 2 (UW2 nt pozice 8 503–8 613) začíná 4 nukleotidy za UAA stop kodonem ORF 1b. Kóduje malý hydrofobní protein označený p4 o velikosti 4 kDa, který na N-konci obsahuje nepolární aminokyseliny formující transmembránový helix. Protein p4 nehraje roli v replikaci ani ve skládání virionu, s největší pravděpodobností ale slouží k intracelulárnímu pohybu viru z buňky do buňky, má funkci 'movement' proteinu (Jelkmann *et al.*, 1997; Peremyslov *et al.*, 1998; Alzhanova *et al.*, 2000; Dolja *et al.*, 2006).

Třetí otevřený čtecí rámec ORF 3 (UW2 nt pozice 8 603–10 459) se jedenácti nukleotidy překrývá s ORF 2. Kóduje 70 kDa velký polypeptid, homolog buněčného heat-shock proteinu 70 (HSP70h). Tento molekulární chaperon HSP70 se nachází u všech eukaryotních organismů, u kterých zastává několik důležitých funkcí, jako je skládání

proteinů a kontrola jejich správné konformace, sestavování multiproteinových komplexů, transport proteinů v buňce nebo ochrana buňky po vystavení tepelnému šoku. Na N-konci obsahuje ATP-ázovou doménu, která je spjatá s ATP hydrolýzou, na C-konci je doména k vazbě proteinů. Přítomnost jeho virového homologu HSP70h u closterovirů se vysvětluje zvýšenými energetickými nároky na translokaci viru z buňky do buňky skrz plasmodesmata způsobenou velmi dlouhým genomem closterovirů, ATP hydrolýza (spojená s HSP70h) dokáže dodatečnou energii dodat. HSP70h dále pomáhá společně s minor pláštěvým proteinem (CPm) a HSP90 formovat a sestavit ocasní část virionu (tail), zajistit jeho správnou délku a napojit ho na tělo virionu tvořeného pláštěvým proteinem. Inaktivací ATP-ázové domény HSP70h dojde k vytvoření virionu bez sestavené koncové části (Lindquist *et Craig*, 1988; Jelkmann *et al.*, 1997; Alzhanova *et al.*, 2001; Dolja *et al.*, 2006).

ORF 4 (UW2 nt pozice 10 431–11 984) se částečně překrývá s koncem ORF3. Kóduje chaperonový polypeptid HSP90 (61 kDa), který se společně s HSP70h a CPm účastní skládání koncové části virionu a na mezibuněčném pohybu (Jelkmann *et al.*, 1997; Alzhanova *et al.*, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2000).

ORF 5 (UW2 nt pozice 12 064–13 278) kóduje pláštěvý protein (CP) o velikosti 46 kDa, který autoagregací vytváří dlouhé tělo virionu, které pokrývá až na 5'-koncovou oblast celý genom. Bylo prokázáno, že CP je ovšem schopný tuto koncovou oblast pokrýt také, a to v případě, pokud nedojde k jejímu sestavení například díky mutaci v kódující oblasti pro CPm. Hlavní funkcí CP je ochrana genomu před degradací během mezibuněčné translokace viru, která trvá řádově 24 hodin (Jelkmann *et al.*, 1997; Alzhanova *et al.*, 2001; Dolja *et al.*, 2006).

Šestý otevřený čtecí rámec ORF 6 (UW2 nt pozice 13 284–15 278) kóduje vedlejší ('minor') pláštěvý protein (CPm) o velikosti 76 kDa. CPm za pomoci HSP70h a HSP90 vytváří 'tail' na 5'-konci virionu dlouhý 600–700 nukleotidů. 'Tail' je specializovaný útvar closterovirů nezbytný k mezibuněčnému pohybu, který je připojený k jinak standardnímu virionu. V *in vitro* podmínkách bylo prokázáno, že při absenci ostatních virových komponent dokáže CPm obalit celý genom. Při inaktivaci pouze pláštěvého proteinu se CPm nerozšířil za hranici koncové oblasti, HSP70h a HSP90 tedy pravděpodobně fungují jako zámek, který nedovoluje CPm pokračovat v obalování

genomu za hranicí 'tailu' (Jelkmann *et al.*, 1997; Alzhanova *et al.*, 2001; Satyanarayana *et al.*, 2004; Agranovsky, 2016).

Poslední otevřené čtecí rámce ORF 7 (UW2 nt pozice 15426–15971) a ORF 8 (UW2 nt pozice 16 008–16 727) jsou lokalizovány blízko 3'-konce genomu. Kódují hypotetické proteiny p21 o velikosti 21 kDa a p27 o velikosti 27 kDa. Jedná se mezi izoláty little cherry virus 1 o velmi konzervativní část genomu. Mezi jednotlivými zástupci rodu *Velarivirus* se ale naopak jedná o oblast velmi variabilní, a to i přes skutečnost, že si jsou velikosti proteinů kódovaných těmito ORF značně podobné. Na základě takto vysoké variability u příbuzných virů lze usuzovat, že proteiny kódované těmito otevřenými čtecími rámci zodpovídají za různé specifické adaptace, které jsou úzce spojené s typem hostitele. Protein p21 slouží jako supresor umlčování RNA a jedná se tedy o obranný mechanismus viru proti hostitelské RNA interferenci, která by zabránila genové expresi viru. K úplnému porozumění proteinu p21 a k objasnění funkce proteinu p27 u LChV1 jsou potřeba další studie (Jelkmann *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2003; Katsiani *et al.*, 2017, 2018a).

3.6 Detekce LChV1

Kvůli latentní infekci je důležité mít účinné metody detekce LChV1, aby nedocházelo k jeho nevědomému šíření. Dnes se virus nejčastěji detekuje pomocí metody RT-PCR a následnou analýzou produktu elektroforetickou separací. K zabránění vzniku falešně pozitivních a falešně negativních výsledků kvůli vysoké variabilitě izolátů jsou cílová místa pro hybridizaci primerů vybírána ze tří nejkonzervativnějších částí virového genomu; genu kódující RNA-dependentní RNA-polymerázu, genu kódující HSP70h a genu kódující plášťový protein. Právě 3'-konec genu pro plášťový protein se zdá jako nejkonzervativnější část napříč izoláty, a tedy ideální cílové místo pro nasedání primerů. Detekce viru je možná i Sangerovým sekvenováním, případně 'high-throughput sequencing' technikou zvanou sekvenování nové generace (NGS). Pokusy o získání spolehlivého séra a protilátek, které by mohly být následně použity k imunochemické detekci LChV1 metodou ELISA byly zatím neúspěšné (Jelkmann *et al.*, 1997, 2008; Matic *et al.*, 2009b; Glasa *et al.*, 2015; Katsiani *et al.*, 2015, 2018b).

3.7 Genetická variabilita LChV1

Čeď *Closteroviridae* se vyznačuje vysokou genetickou variabilitou a little cherry virus 1 není výjimkou. LChV1 izoláty se mezi sebou liší v nukleotidové sekvenci až z 25–35 % a neobvyklá není ani rozdílná délka kódovaných peptidů. Diverzita v aminokyselinových sekvencích genů pro RdRp, HSP70h a CP by však neměla dosahovat hodnoty vyšší než 25 %, jinak by se podle stanovených kritérií už taxonomicky nejednalo o *Little cherry virus 1*. Hraničních hodnot variability dosahuje izolát G15_3 (Acc. No. LN794218), který překračuje hranici diverzity v genu pro CP (26–28 %), v genu pro RdRp vykazuje ale pouze 8–10% diverzitu s ostatními izoláty dostupných v databázi GenBank a díky tomu se zařazuje mezi LChV1 (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Fuchs *et al.*, 2020).

Nejkonzervativnější částí genomu LChV1 izolátů jsou také 5'-nepřekládaná oblast a 3'-koncová část genomu, která kóduje protein p21 a protein p27 (ORF 7 a 8). U izolátů UW2 (Acc. No. NC_001836) a ITMAR (Acc. No. EU715989) však došlo k inzerci cytosinu v nt pozici 15 402, což má za následek syntézu o 50 aminokyselin kratšího proteinu p21. U izolátu YD (Acc. No. KR080325) došlo k inzerci adeninu v nt pozici 16 044, což vyústilo v protein p27 kratší o 19 aminokyselin. Největší rozdíl v délce kódovaných proteinů je v genu pro HSP70h (ORF 3), který jinak vykazuje vysokou procentuální identitu. Izoláty ITMAR a UW2 mají tento otevřený čtecí rámec o 67 aminokyselin delší než ostatní izoláty v GenBank. Kratší produkt byl způsoben jednonukleotidovou inzercí v ORF 3, která zapříčinila vznik dřívějšího stop kodonu. Vysokou variabilitu vykazuje 3' nepřekládaná oblast a ORF 2, který kóduje hydrofobní protein p4. Izoláty UW2 a ITMAR se opět odlišují v délce, mají tento otevřený čtecí rámec o 5 aminokyselin delší než například izoláty G15_3, Kyoto-2 (Acc. No. MG934545), PHLC28 5 (Acc. No. HG792417), No2 ISTO (Acc. No. HG792418) nebo G18_2 (Acc. No. HG792419) (Jelkmann *et al.*, 1997; Matic *et al.*, 2009a; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Wang *et al.*, 2016).

Na základě fylogenetické analýzy celogenomových nukleotidových sekvencí a aminokyselinových sekvencí genů pro RdRp, HSP70h a CP byly LChV1 izoláty dostupné v GenBank rozvětveny do pěti fylogenetických skupin G1–G5. První skupina byla tvořena izoláty z třešně, višně, slivoně švestky a broskvoně, konkrétně izolátem V2356 (Acc. No. JX669615) nebo G18_2. Do G2 byly zařazeny izoláty z třešně obecné,

např. čínský izolát Taian (Acc. No. KR736335), australský izolát LVV (Acc. No. LC523024) nebo španělský izolát Jerte (Acc. No. KX192366). Německý referenční izolát UW2 izolovaný z třešně obecné byl zařazen do skupiny G3 společně např. s italským izolátem ITMAR, řeckým izolátem C118-Iso15 (Acc. No. MH364116) nebo českým izolátem z meruňky Apr153 (Acc. No. MN242215). Nejvzdálenější skupina G4 byla tvořena řeckými izoláty G15_3 a C118-Iso1 (Acc. No. MH364114). V roce 2018 byla poprvé ustanovena fylogenetická skupina G5, zastoupená japonským izolátem Kyoto-2. Dnes již do skupiny G5 patří i český izolát Apr184R (Acc. No. MN242219) nebo australský izolát LV27S2 (Acc. No. LC523023) (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Wang *et al.*, 2016; Kinoti *et al.*, 2020; Šafářová *et al.*, 2020).

Dřívější studie naznačovaly, že genetická variabilita LChV1 izolátů může souviset s jejich místem původu a lze je tedy rozdělit např. na izoláty euroasijské a americké. Výzkum identity sekvencí dnes dostupných izolátů v databázi GenBank a jejich fylogenetické analýzy však vyvrací existenci korelací nejen mezi vysokou variabilitou a geografickým původem, ale i typem hostitele a intenzitou symptomů. Souvislost mezi variabilitou a typem hostitele lze vyvrátit i na konkrétním případě třešně obecné, která byla zároveň infikována třemi rozdílnými genotypy LChV1, z nichž každý genotyp patřil do jiné fylogenetické skupiny. Dalším příkladem můžou být izoláty ITMAR a V2356, které u sakury ozdobné způsobují dvě choroby, Kwanzan stunting syndrome (ITMAR) a Shirofugen stun disease (V2356). Obě choroby, které jsou spojené se stejným typem hostitele, mají velmi podobné symptomy. I přes to se však izolát ITMAR řadí do fylogenetické skupiny G3, zatímco izolát V2356 je více podobný severo-americkým izolátům a spadá do skupiny G1 (Bajet *et al.*, 2008; Matic *et al.*, 2009a; Candresse *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a).

Příčina vzniku vysoké variability u izolátů LChV1 není zatím přesně známa. U RNA virů byl však jako silná hnací síla pro tvorbu nových variant identifikován proces rekombinace. U LChV1 byla zaznamenána přirozená homologní rekombinace výjimečně, a to u řeckého izolátu No2 ISTO v genu pro RdRp, u italského izolátu ITMAR v 3'-koncové části genomu a u australských izolátů LVV, LV16 a TAS16 v genech pro RdRp, HSP70h a CP. Je pravděpodobné, že rekombinace sehrála roli v evoluci a ve tvorbě nových variant i u little cherry virus 1, k potvrzení hypotézy jsou ale potřeba další studie (Karasev *et al.*, 2000; Farooq *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Byly testovány 4 vzorky mandloně obecné (*Prunus dulcis*), původem z Horních Věstonic, Česká republika. Listy jednotlivých stromů byly odebrány v dubnu 2020 a uchovány v mrazícím boxu při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 96–100% ethanol (Lach-Ner; 20025-A96)
- 2-merkaptoethanol (Serva; kat. č. 28625)
- Agarose for DNA elektroforesis (Serva; kat.č. 11404.05)
- BioScript Reverse Transcriptase (Bioline; BIO-27036)
- GeneRulerTM 100 bp DNA ladder (Fermentas; kat. č. SM0243)
- GeneRulerTM 100 bp+ DNA (Fermentas, kat. č. SM0323)
- dNTP Mix (10 mmol·dm⁻³ each) (Fermentas; kat.č. R0192)
- Ethidium bromide (EB), (10 μg·ml⁻¹ in H₂O) (Biotium; kat. č. 40042)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium; kat.č. 41002)
- Isopropanol (Lach-Ner; kat.č. 20037-AT0)
- MyFiTM Mix (Bioline; kat. č. BIO-25049)
- MyTaq DNA Polymerase (Bioline; BIO-21105)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega; kat.č. N211B)
- Random Hexamer Primers (Bioline; kat.č. BIO-38028)

Použité soupravy

- Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems; kat. č. 4337458)
- Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.; kat. č. 25800)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN; 28706)

Použité roztoky a jejich příprava

50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit do 1 000 ml.

0,1% bromfenolová modř v 30% glycerinu.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)
- Dokumentační systém G:BOX (Syngene Ltd.)
- Elektroforetická komora HU10 MINI (Scie-Plas)
- Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hoefer)
- Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Minicentrifuga PRISMTM mini (Labnet International, Inc.)
- Power Station 300 (Labnet)
- Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- Thermocycler T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD)
- Thermocycler T personal (Biometra)
- UV-transluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing Block MB-102 (Bioer)
- Zdroj stejnosměrného proudu MP-250V (Major Science)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

RNA byla izolována z listů mandloně obecné pomocí Plant/Fungi Total RNA Purification kitu. Před každou izolací byl připraven čerstvý lyzační pufr smícháním 600 μ l Lysis pufru C a 6 μ l 2-merkptoethanolu na jednu izolaci. Do 2ml homogenizační zkumavky bylo přidáno 50 mg listu a 600 μ l Lysis pufru C. Vzorek byl homogenizován pomocí lysis matrix A třepáním po dobu 45 s při rychlosti 5,5 m·s⁻¹ v homogenizátoru FastPrep. Vzorek byl 5 min inkubován při teplotě 55 °C, v průběhu inkubace byl 3x promíchán převrácením zkumavky. Veškerý lyzát byl přepipetován do filtrační kolony vložené ve sběrné zkumavce a 2 min centrifugován při 14 000 RPM. Filtrát bez sedimentu byl přepipetován do nové 1,5ml mikrozkušavky, poté byl přidán 96–100% ethanol v poměru 1:1 k objemu supernatantu a vzorek byl promíchán na vortexu. Směs byla přenesena do spin kolony umístěné ve sběrné zkumavce a po dobu 60 s centrifugována při 6 000 RPM. Pokud roztok přes fritu spin kolony neprotekl, byla opakována centrifugace po dobu 60 s při 14 000 RPM. Obsah sběrné zkumavky byl vylit. Do spin kolony bylo přidáno 400 μ l Wash Solution A a spin kolona ve sběrné zkumavce byla 60 s centrifugována při 14 000 RPM. Obsah sběrné zkumavky byl vylit. Promytí pomocí 400 μ l Wash Solution A bylo celkem provedeno 3x, obsah sběrné zkumavky byl po každé centrifugaci odstraněn. Spin kolona ve sběrné zkumavce byla vysušena centrifugací po dobu 2 min při 14 000 RPM a následně vložena do čisté 1,7ml eluční zkumavky. Přímo na fritu spin kolony bylo napipetováno 50 μ l Elution Solution A a spin kolona byla centrifugována 2 min při 2 000 RPM a následně 1 min při 14 000 RPM. Obsah prošlý do eluční zkumavky byl z důvodu zvýšení výtěžnosti RNA opět napipetován na fritu a centrifugován 2 min při 2 000 RPM a 1 min při 14 000 RPM. Eluční zkumavka s izolovanou RNA byla krátkodobě uchována na ledu a uchována při teplotě -70 °C. Koncentrace vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometricky.

4.4.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do komplementární DNA pomocí Random Hexamer Primers a BioScript™ Reverse Transcriptase.

Byly připraveny 2 reakční směsi podle tabulky 1. Všechny reagenty byly po dobu přípravy uchovány na ledu.

Reakční směs I byla připravena pro 4 vzorky a byla rozpipetována do 200 μ l mikrozkušavek po 7 μ l. Do každé reakce byly přidány 3 μ l izolované RNA o koncentraci cca 150 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Následně byly zkumavky s reakční směsí I inkubovány 5 min při teplotě 70 °C a poté byly okamžitě umístěny zpět na led.

Reakční směs II byla připravena pro 4 vzorky a následně byla rozpipetována po 20 μ l k reakční směsi I. Výsledné roztoky o objemu 30 μ l byly promíchány a vloženy do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek: 25 °C po dobu 10 min, 42 °C po dobu 30 min, 85 °C po dobu 5 min. Po uběhnutí reakce byly vzorky uchovány v -20 °C.

Tabulka 1: Složení reakční směsi I a II pro reverzní transkripci.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μ l] (jeden test)
Reakční směs I			
dH ₂ O			4
dNTP	10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,5
Random Hexamers	20 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,5
Reakční směs II			
dH ₂ O			12
RT-PCR pufr	5x	1x	6
Inhibitor ribonukleáz	40 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	40 $\text{U}\cdot\text{reakce}^{-1}$	1
BioScript RT	200 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	10 $\text{U}\cdot\text{reakce}^{-1}$	1
Objem reakce			30

4.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.4.3.1 Detekce LChV1

Detekce little cherry virus 1 byla provedena pomocí MyTaq DNA Polymerase a specifických primerů 1LC_12776F/1LC_13223R (Glasa *et al.*, 2015) a LCV1U_16390/LCV1L_16809 (Rott *et Jelkmann*, 2001). cDNA získaná reverzní transkripcí z RNA byla použita jako templátové vlákno pro PCR amplifikaci. Sekvence použitých primerů a velikost očekávaného specifického produktu jsou uvedeny v tabulce 2.

PCR reakční směs byla namíchána pro více vzorků podle tabulky 3 a byla rozpipetována do 200 μ l mikrozkušavek po 18 μ l. Do každé reakce byly přidány 2 μ l vzorku cDNA. Výsledné roztoky o objemu 20 μ l byly vloženy do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 4. Produkty PCR byly uchovány při -20 °C.

Tabulka 2: Seznam použitých detekčních primerů.

Název primeru	Sekvence 5'-3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
1LC_12776F 1LC_13223R	TCAAGAAAAGTTCTGGTGTGC CGAGCTAGACGTATCAGTATC	448	Glasa <i>et al.</i> (2015)
LCV1U_16390 LCV1L_16809	TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA GGTAAGCGGTATAAAAACCCCTCCTCT	420	Rott <i>et Jelkmann</i> (2001)

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi (na jeden test).

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μ l] (na jeden test)
Pufr	5x	1x	4,0
Voda			13,4
Forward primer*	20 pmol· μ l ⁻¹	0,2 pmol· μ l ⁻¹	0,2
Reverse primer*	20 pmol· μ l ⁻¹	0,2 pmol· μ l ⁻¹	0,2
MyTaq DNA polymeráza	5 U· μ l ⁻¹	1 U·reakce ⁻¹	0,2
Celkem			18
Objem reakce			20

* Použité forward a reverse primery viz Tabulka 2.

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace.

Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	180	1
denaturace	95	30	40
nasedání primerů	*	30	
elongace	72	30	
konečná elongace	72	300	1

* Primery Glasa *et al.* (2015) 52 °C; primery Rott *et Jelkmann* (2001) 55 °C.

4.4.3.2 Amplifikace specifických genomických úseků

Amplifikace genomických oblastí byla provedena pomocí MyFi™ Mix (Bioline) a specifických primerů. Seznam použitých primerů je v tabulce 7. Jako templát byla využita cDNA získaná reverzní transkripcí.

PCR reakční směs byla namíchána na více testů podle tabulky 5 a byla rozpipetována do 200 µl mikrozkušavek po 23 µl. Do každé reakce byly přidány 2 µl cDNA vzorku. Reakční směs o konečném objemu 25 µl byla promíchána a zkumavky byly vloženy do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 6, nastaveny byly individuálně pro každou dvojici primerů. Výsledné produkty PCR byly dlouhodobě uchovány při -20 °C.

Tabulka 5: Příprava PCR reakční směsi.

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [µl] (na jeden test)
MyFi Mix	2x	1x	12,5
Voda			9,5
Forward primer*	20 pmol·µl ⁻¹	0,4 pmol·µl ⁻¹	0,5
Reverse primer*	20 pmol·µl ⁻¹	0,4 pmol·µl ⁻¹	0,5
Celkem			23
Objem reakce			25

* Použité forward a reverse primery viz Tabulka 7.

Tabulka 6: Podmínky PCR amplifikace.

Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	180	1
denaturace	95	60	40
nasedání primerů	*	60	
elongace	72	**	
konečná elongace	72	300	1

* viz Teplota nasedání primerů v tabulce 7

** viz Velikost PCR produktu v tabulce 7; **135 s** pro očekávanou velikost PCR produktu ± 3000 bp; **120 s** pro očekávanou velikost PCR produktu ± 2500 bp; **90 s** pro očekávanou velikost PCR produktu 1000–2000 bp; **45 s** pro očekávanou velikost PCR produktu méně než 1000 bp.

Tabulka 7: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Pozice	Velikost PCR produktu [bp]	Teplota nasedání primerů [°C]
IN1for *	CGTTTTTATCTCCCAGCTTTGTGCCT	1–26	3 151	56
LChV1_R3seq	CCAGACGGATTCCCTCAGAT	3 151–3 132		
LChV1_F1seq	TTTATCTCCCAGCTTTGTGCCT	5–26	3 147	56
LChV1_R3seq	CCAGACGGATTCCCTCAGAT	3 151–3 132		
184R-3070F	TGTTATTTACAACGGTAAGGT	3 051–3 071	1 926	51
184R-4995R	GTAAGAAATTGTGACGAGC	4 976–4 963		
184R-4878F	AAATGGCTATMGTTTCCGGTTC	4 856–4 877	2 610	55
184R-7484R	CCTTCTATCACGAGATAATAACCAAG	7 465–7 440		
M2for *	GGAACCAAGCCGTTTGGCTG	7 378–7 397	2 912	56
LChV1_R10seq	ACAGTCGAACACTACCAAGCGT	10 289–10 270		
LChV1_F11seq	ACCGAATTAGGAATGAAATGGAGA	10 223–10 247	2 997	53
1LC_13223R **	CGAGCTAGACGTATCAGTATC	13 219–13 199		
1LC_12776F **	TCAAGAAAAGTTCTGGTGTGC	12 788–12 768	1 385	53
LCV1_1413as	AATTTTCCAACTTCACA	14 172–14 154		
1for *	TAGCTGTGGCGCTGACTCTAG	11 522–11 542	2 649	53
184R-14144R	TCCAAACTTCACATCCAAAA	14 170–14 151		
184R-14011F	TGYTCAGATGAATCTCATGA	14 011–14 030	2 591	50
184R-16595R	TCCCAACCAGACAAGTCACG	16 601–16 582		
LCV1U_16390 ***	TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA	16 385–16 406	548	53
LCV_3EC	GGTAGGCACCTTTTATTTTTATATATG	16 932–16 905		

* Reference: Matic *et al.* (2009a); ** reference: Glasa *et al.* (2015); *** reference: Rott *et al.* Jelkmann (2001); neoznačené primery byly navrženy vedoucí práce.

4.4.4 Elektroforetická separace

Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena v 1% agarózovém gelu. Zásobní roztok 1% agarózového gelu byl připraven rozpuštěním 3 g agarózy v 300 ml 1x TAE pufru a následným zahřátím v mikrovlnné troubě. Ze zásobního roztoku bylo odebráno 50 ml a zbytek byl uchován v chladničce při ± 4 °C. K 50 ml 1% agarózového gelu bylo

přidáno 2,5 μl barviva GelRed Nucleic Acid Stain, směs byla důkladně promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s vloženým hřebínkem. Gel byl po ztuhnutí převrstven 1x TAE pufrem a následně z něj byl vyňat hřebínek. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 μl standardu GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, do dalších jamek 5 μl PCR produktu. Separace amplikonů probíhala při 80 V po dobu minimálně 45 min. Gel byl vyhodnocen pomocí UV-transiluminátoru a dokumentačního systému G:BOX.

4.4.5 Izolace PCR produktu z gelu

Izolace PCR produktu z gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction kitu.

75 ml 1% agarózy a 5 μl ethidium bromidu ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bylo důkladně promícháno a přelito do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel byl po ztuhnutí převrstven 1x TAE pufrem. Do první jamky bylo naneseo 1,5 μl standardu GeneRuler™ 100 bp DNA ladder. Do dalších jamek byl napipetován veškerý PCR produkt smíchaný s 5 μl 0,1% bromfenolové modři v glycerinu; pokud objem přesáhl 10 μl , byl rozdělen do více jamek vedle sebe. Elektroforetická separace probíhala 1 h při 80 V.

Gel byl umístěn na UV-transluminátor určený k vyřezávání z gelu a každý PCR produkt byl sterilním skalpelem vyříznut a umístěn do předem zvážené 1,5ml mikrozkušavky. Vyříznutý gel byl smíchan s QG pufrem v objemovém poměru 1:3, tj. při navážce 100 μg bylo přidáno 300 μl QG pufru. Mikrozkušavky byly inkubovány cca 5 min při 50 °C v dry-bloku, s občasným promícháváním na vortexu v intervalech 2–3 min až do úplného rozpuštění gelu. Do každé mikrozkušavky byl přidán izopropanol v objemovém poměru 1:1, tj. při navážce 100 μg gelu bylo přidáno 100 μl izopropanolu. Maximálně 700 μl roztoku bylo napipetováno do fialové kolony vložené ve sběrné zkumavce a centrifugováno 1 min při 13 000 RPM. Filtrát byl odstraněn. Do kolony bylo přidáno 500 μl QG pufru a kolona byla centrifugována při 13 000 RPM po dobu 1 min. Filtrát byl následně odstraněn. Do kolony bylo přidáno 700 μl PE pufru a kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 RPM. Filtrát byl odstraněn. Kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 RPM a následně umístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky. DNA byla eluována v 30 μl deionizované vody, kolona byla po jejím napipetování centrifugována 1 min při 13 000 RPM. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí fluorimetru a následně byla vyizolovaná DNA uchována při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.6 Sekvenační značení

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kitu.

Vyizolované PCR produkty byly pro jednotlivá značení naředěny v závislosti na velikosti na optimální koncentraci tak, aby 6 µl obsahovalo: 50 ng DNA o velikosti 2–3 kbp, 25 ng DNA o velikosti 1–2 kbp a 20 ng DNA o velikosti menší než 1 kbp.

Byla připravena směs BigDye™ Terminator v. 3.1 polymerázy a pufru v poměru 1:1. 2 µl této směsi byly přidány k 6 µl naředěného vzorku DNA, ke kterému byly dále přidány 2 µl primeru (1,6 pmol·µl⁻¹). Fragmenty DNA byly sekvenovány oboustranně pomocí koncových amplifikačních primerů (viz tabulka 7). V případě delších fragmentů byly použity pro sekvenování vnitřních úseků primery uvedené v tabulce 8. Po dobu práce byly všechny reagensie uchovávány na ledu. Roztok byl promíchán a vložen do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 9. Vzorky byly následně analyzovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB AV ČR, CR-Haná, Olomouc.

Tabulka 8: Seznam primerů použitých k sekvenačnímu značení vnitřních úseků.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Pozice
184R-630F	TCACTGGACGTATGATGCAGAT	639–660
184R-2485R	TTCAACCATAACAGCTCGAT	2 493–2 474
184R-5611	GTGAAGAATTGCCTATGTGC	5 621–5 640
184R-6795F	TGTTGTGCAATCTCAACCTA	6 786–6 805
LChV1_F9.3seq	ACGATTTTGGTATGGATGCA	8 124–8 143
184R-10930F	AGATGCGAAGTCCACTGATTT	10 935–10 955
LChV1_F16seq	GATTAACGACCCAAGAGCACG	15 185–15 205
184R-15331R	CTTGAGTTGCGAAAGTGTC	15 337–15 318

Tabulka 9: Podmínky sekvenačního značení.

Proces	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
počáteční hybridizace	95	60	1
hybridizace	95	10	
nasedání primerů	50	5	40
elongace	60	240	

4.4.7 Bioinformatická analýza

Získaná sekvenční data byla sestavena do parciálních a následně finálního genomického contigu pomocí programu SeqMan Lasergene (DNASTar, Inc.) a Alignment Explorer (MEGA v. 7.0) (Kumar *et al.*, 2016). Kontrola správnosti byla provedena přiřazením získané sekvence k sekvenci příbuzného izolátu Apr184R pomocí Alignment Explorer (MEGA v. 7.0). Analýza primárních sekvenčních výstupů byla z důvodu restrikcí spojených s pandemií COVID-19 provedena na pracovišti Katedry buněčné biologie a genetiky dr. D. Šafářovou. Identita sekvence byla následně potvrzena pomocí programu NCBI – BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). V programu pDRAW32 byla vytvořena genomická mapa s vyznačenými otevřenými čtecími rámci a místy nasedání primerů. V databázi GenBank byly vyhledány známé genomické sekvence LChV1 izolátů, které byly společně se získanou sekvencí prostřednictvím programu MEGA seřazeny v mnohočetný alignment pomocí funkce ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Pomocí programu NCBI – ORF Finder (Pruitt *et Maglott*, 2001) byly získány předpokládané otevřené čtecí rámce, které byly následně identifikovány v programu pDRAW32. Kontrola a korekce jejich umístění s ohledem na strukturu genomu LChV1 byla provedena porovnáním s příbuzným izolátem Apr184R (MN242219). Variabilita nukleotidových a aminokyselinových sekvencí analyzovaných izolátů a jejich jednotlivých ORF byla vyhodnocena pomocí metody p-distance v programu MEGA a vizualizována prostřednictvím 'heat' mapy vytvořené v programu SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014). Mnohočetný alignment byl následně v programu MEGA použit při fylogenetické analýze pomocí algoritmu Neighbor-Joining (Felsenstein, 1985; Saitou *et Nei*, 1987). Pro nukleotidové sekvence byl použit Tamura 3-parametrický model (Tamura, 1992), pro aminokyselinové sekvence model JTT (Jones *et al.*, 1992). Použitím funkce TreeExplorer programu MEGA byl vizualizován fylogenetický strom studovaných izolátů.

5 VÝSLEDKY

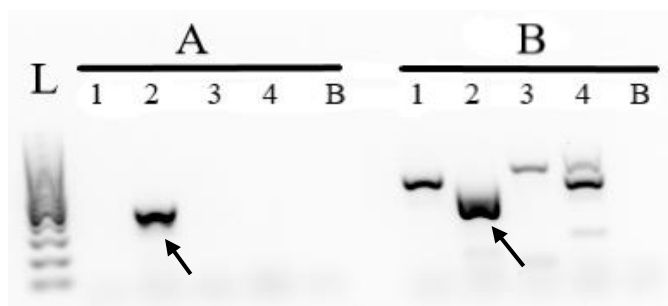
Cílem experimentální části bakalářské práce byla molekulárně genetická charakteristika LChV1 izolátu infikujícího mandloň obecnou (*Prunus dulcis*). Na přítomnost viru byly testovány 4 stromy mandloňe obecné, jejichž listy byly odebrány v Horních Věstonicích v ulici Mandloňová, na jižní Moravě, na jaře roku 2020. Listy jednoho ze zkoumaných stromů, u kterého byla již dříve prokázána infekce LChV1, vykazovaly chlorotické mozaiky typické pro LChD. Ostatní stromy nevykazovaly žádné typické příznaky spojované s LChV1, bylo pozorováno žloutnutí a zmenšování listů.

5.1 Detekce a amplifikace specifických genomických úseků LChV1

Čtyři vzorky mandloňe obecné Alm137, Alm138, Alm139 a Alm140 byly testovány na přítomnost LChV1 pomocí RT-PCR a specifických primerů.

Virus byl detekován pouze ve vzorku Alm138. S použitím specifických primerů LCV1U_16390/LCV1L_16809 podle Rott *et* Jelkmann (2001) byl získán PCR produkt o očekávané velikosti \pm 420 bp, s použitím specifických primerů 1LC_12776F/1LC_13223R podle Glasa *et al.* (2015) byl získán PCR produkt o očekávané velikosti \pm 450 bp.

U zbývajících tří vzorků mandloňe nebyl s použitím primerů LCV1U_16390/LCV1L_16809 získán produkt žádný, použitím druhé kombinace primerů 1LC_12776F/1LC_13223R byly získány nespecifické produkty, které velikostí neodpovídaly očekávání (viz Obrázek 3).

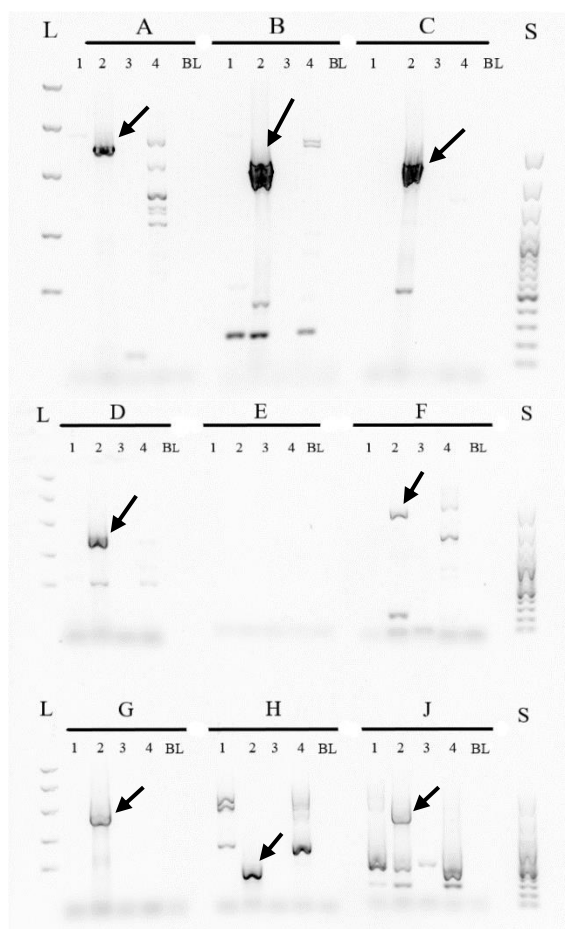


Obrázek 3: Detekce little cherry virus 1 pomocí primerů (A) podle Rott *et* Jelkmann (2001) a (B) primerů podle Glasa *et al.* (2015).

Legenda: (L): standard GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, (1): Alm137, (2): Alm138, (3): Alm139, (4): Alm140, (B): slepý vzorek (H₂O), specifický produkt označen šipkou.

Do amplifikace specifických genomických úseků byly zahrnuty kromě potvrzeného vzorku Alm138 i zbylé tři vzorky, aby se vyloučila potencionální variabilita viru, která by mohla zapříčinit nenasednutí primerů LCV1U_16390/LCV1L_16809 a tím falešnou negativitu, anebo odlišnou velikost produktů u primerů 1LC_12776F/1LC_13223R.

Specifické produkty odpovídající očekávané velikosti amplifikovaných fragmentů byly získány pouze u vzorku Alm138. Produkt byl získán pomocí všech použitých kombinací primerů, až na dvojici 1for/184R-14144R. U ostatních vzorků nebyl získán buď produkt žádný, nebo velikostí neodpovídal očekávání (viz Obrázek 4).



Obrázek 4: Amplifikace specifických genomických úseků little cherry virus 1 pomocí specifických primerů.

Legenda: (A-J) kombinace primerů: (A) LChV1_F1seq/LChV1_R3seq, (B) LChV1_M2for/LChV1_R10seq, (C) LChV1_F11seq/1LC_13223R, (D) 184R-3070F/ 184R-4995R, (E) 1for/184R-14144R, (F) IN1for/LChV1_R3seq, (G) 184R-4878F/184R-7484R, (H) LCV1U_16390/LCV_3EC, (J) 184R-14011F/ 184R-16595R; (L) GeneRuler™ 100 bp DNA ladder; (S) GeneRuler™ 100 bp+ DNA ladder; označení vzorků (1) Alm137, (2) Alm138, (3) Alm139, (4) Alm140, (BL) slepý vzorek (H₂O); specifický produkt označen šipkou.

Přítomnost LChV1 byla prokázána pouze u vzorku Alm138, který pocházel z příznakové mandloně obecné. Potvrdila se tak již dřívější detekce viru u tohoto konkrétního stromu. U ostatních stromů ležících v bezprostřední blízkosti příznakové mandloně little cherry virus 1 detekován nebyl. Nepotvrdilo se podezření, že stromy jsou infikované LChV1.

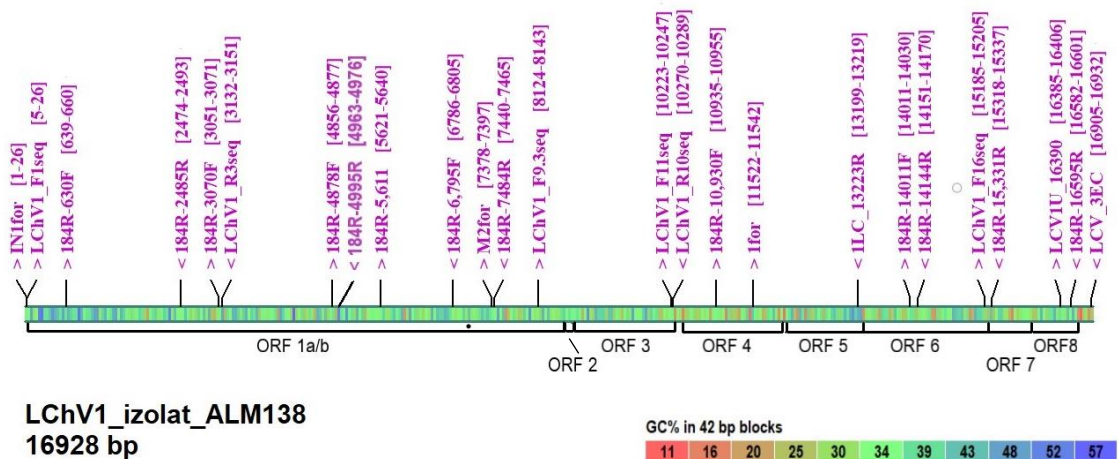
5.2 Molekulárně genetická charakteristika izolátu Alm138

Spojením jednotlivých fragmentů byla získána kompletní genomická sekvence LChV1 izolátu Alm138 o délce 16 928 nt. V genomu bylo identifikováno 8 otevřených čtecích rámců, poloha jednotlivých ORF a jejich charakteristika jsou shrnuty v tabulce 10 a na obrázku 5. Netranslatovaná oblast 5' UTR byla dlouhá 75 nukleotidů, 3' UTR byla dlouhá 206 nukleotidů.

Při porovnání této nukleotidové sekvence pomocí algoritmu BLASTN vykazoval izolát Alm138 nejvyšší identitu s izoláty Apr184R (96,2 %, Acc. No. MN242219), Kyoto-2 (92,1 %, Acc. No. MG934545) a BJ (91,9 %, Acc. No. MK775591). S ostatními izoláty, jejichž genomy byly dostupné v databázi GenBank, vykazoval identitu 73,2–91,1 % (viz Tabulka 11, Obrázek 6).

Tabulka 10: Charakteristika jednotlivých otevřených čtecích rámců LChV1 izolátu Alm138.

Označení ORF	Nukleotidová pozice	Počet aminokyselin	Velikost [kDa]
ORF 1a/b	76–6 948, 6 950–8 497	2 806	318
ORF 2	8 502–8 597	31	3,5
ORF 3	8 602–10 257	551	62
ORF 4	10 429–11 982	517	60
ORF 5	12 062–13 276	404	46
ORF 6	13 282–15 270	662	76
ORF 7	15 271–15 966	231	26,5
ORF 8	16 003–16 722	239	27,5



Obrázek 5: Genomická mapa LChV1 izolátu Alm138 s vyznačenými ORF a místy nasedání amplifikačních primerů. Barevná škála reprezentuje procentuální zastoupení guaninu a cytosinu.

První a zároveň nejdelší otevřený čtecí rámeček ORF 1a/b (nt pozice 76–8 497) kóduje 2 806 aminokyselin dlouhý polypeptid (318 kDa) s doménami pro PLP, MET, HEL a RdRp. Jako nukleotid, který je v případě frameshiftu při translaci ORF 1 „přeskočen“, byl determinován adenin na nukleotidové pozici 6 949. Tato pozice odpovídá stop kodonu ORF 1a (nt pozice 6 949). V případě absence frameshiftu kóduje ORF 1a 2 290 aminokyselin dlouhý polypeptid (258,5 kDa) bez domény pro RdRp. Nejvyšší identita byla zjištěna s českým izolátem Apr184R získaným z meruňky, a to 96,0 % v nukleotidové sekvenci a 96,2 % v aminokyselinové sekvenci. S ostatními izoláty vykazoval Alm138 identitu 73,5–92,0 % v nukleotidové sekvenci a 79,4–94,1 % v aminokyselinové sekvenci. Nejnižší identitu v ORF 1a/b vykazoval Alm138 vůči italskému izolátu ITMAR (Acc. No. EU715989), a to 67,5 % v nukleotidové sekvenci a 68 % v aminokyselinové sekvenci (viz Tabulka 11, Obrázek 6).

Nejkratší otevřený čtecí rámeček ORF 2 (nt pozice 8 502–8 597) kóduje 31 aminokyselin dlouhý protein p4 (3,5 kDa). Identita v nukleotidové sekvenci byla 70,8–94,8 %, přičemž nejvyšší podobnost byla zjištěna s izolátem Apr184R, nejnižší podobnost vykazoval český izolát Apr153 (Acc. No. MN242215) z meruňky obecné. 100% identitu v aminokyselinové sekvenci vykazoval Alm138 s australským izolátem LV27S2 získaným z třešně obecné (Acc. No. LC523023), oproti tomu s českým izolátem Apr153 měl Alm138 podobnost pouhých 64,5 %. S ostatními známými izoláty vykazoval izolát Alm138 identitu v aminokyselinové sekvenci 67,7–96,8 %. (viz Tabulka 11, Obrázek 6).

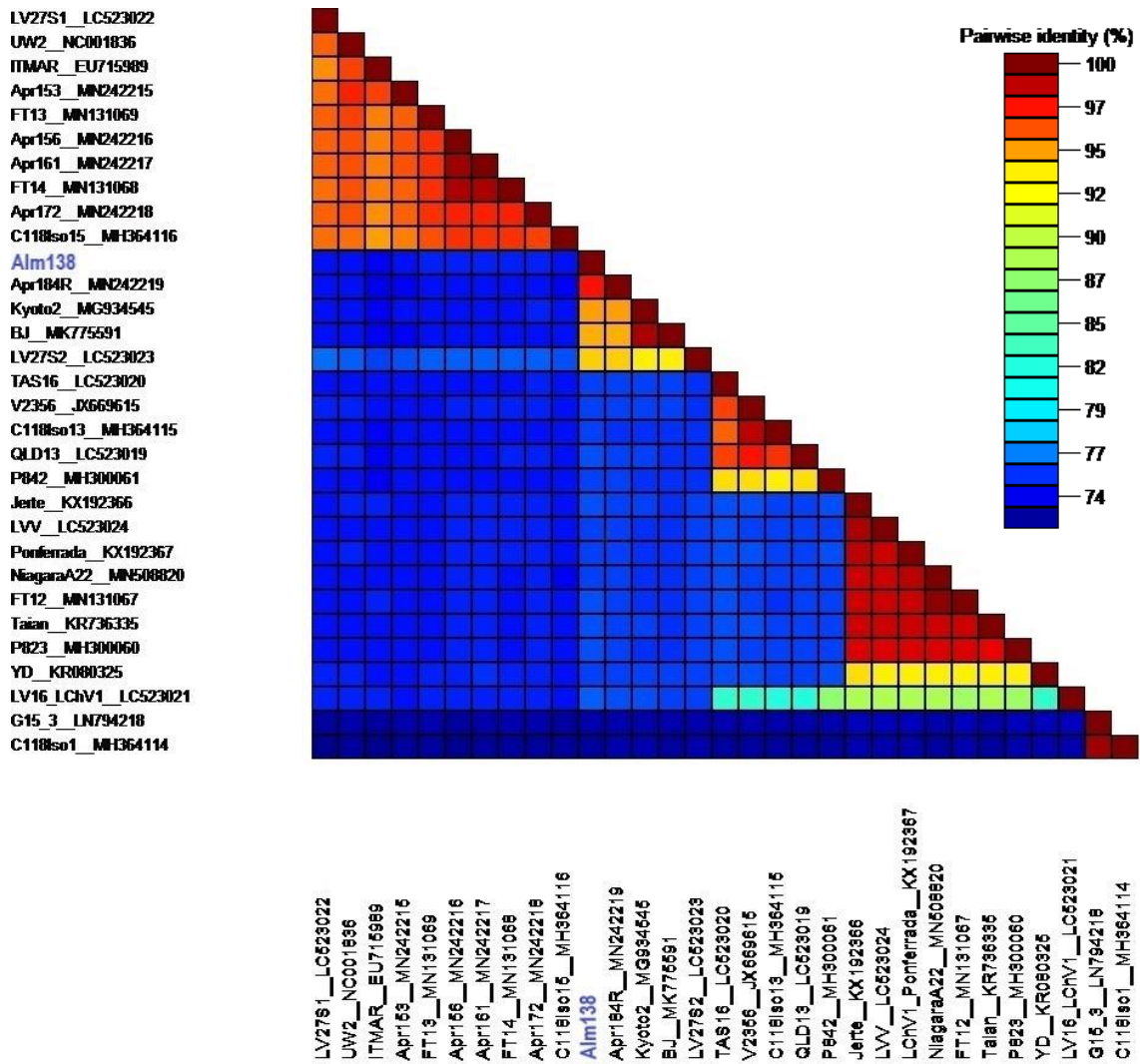
ORF 3 (nt pozice 8 602–10 257) kóduje protein HSP70h dlouhý 551 aminokyselin (62 kDa). Tento otevřený čtecí rámeček vykazoval vysokou shodu napříč izoláty. V nukleotidové sekvenci se Alm138 shodoval s dostupnými izoláty z 75,5–96,9 %, v aminokyselinové sekvenci z 82,8–97,5 %. Nejvyšší shoda byla opět s izolátem Apr184R.

Čtvrtý otevřený čtecí rámeček ORF 4 (nt pozice 10 429–11 982) kóduje 517 aminokyselin dlouhý chaperonový protein HSP90 (60 kDa). Nejvyšší identitu vykazoval Alm138 vůči izolátu Apr184R, 97,0 % v nukleotidové sekvenci a 97,3 % v aminokyselinové sekvenci. S ostatními izoláty vykazoval Alm138 identitu 73,5–93,6 % v nukleotidové sekvenci, v aminokyselinové sekvenci pak 75,4–95,7 %.

ORF 5 (nt pozice 12 062–13 276) a ORF 6 (nt pozice 13 282–15 270) kódují 404 aminokyselin dlouhý plášťový protein (46 kDa) a 662 aminokyselin dlouhý plášťový protein minor (76 kDa). V obou čtecích rámcích vykazoval Alm138 s ostatními izoláty podobné hodnoty identity. V genu pro CP se jednalo o hodnoty v rozmezí 70,2–95,1 % v nukleotidové sekvenci a 70,3–92,6 % v aminokyselinové sekvenci. V genu pro CPm se s ostatními izoláty v nukleotidové sekvenci shodoval Alm138 z 69,8–96,2 %, v aminokyselinové sekvenci z 67,8–95,3 %. Nejvyšší identita v obou otevřených čtecích rámcích byla s českým izolátem Apr184R. Nejnižší podobnost vykazoval řecký izolát získaný z třešně obecné C118-Iso1 (Acc. No. MH364114).

Sedmý otevřený čtecí rámeček ORF 7 (nt pozice 15 271–15 966) kóduje 231 aminokyselin dlouhý protein p21 (26,5 kDa). Jedná se o nejkonzervativnější část genomu studovaných izolátů. Identita izolátu Alm138 vůči dostupným izolátům byla 78,3–97,4 % v nukleotidové sekvenci a 83,8–99,1 % v aminokyselinové sekvenci. Nejvyšší podobnost byla s izolátem Apr184R.

Poslední otevřený čtecí rámeček ORF 8 (nt pozice 16 003–16 722) kóduje 239 aminokyselin dlouhý hypotetický protein p27 (27,5 kDa). Nejnižší identitu 73,5 % v nukleotidové sekvenci a 70,2 % v aminokyselinové sekvenci vykazoval řecký izolát G15_3 (Acc. No. LN794218). Se zbylými izoláty vykazoval Alm138 podstatně vyšší identitu, konkrétně 77,2–96,8 % v nukleotidové sekvenci a 79,0–96,2 % v aminokyselinové sekvenci. Nejvyšší shodu vykazoval izolát Apr184R.



Obrázek 6: SDTv1.2 analýza identity kompletních genomových sekvencí LChV1 izolátů. Barevná škála reprezentuje procentuální identitu. Studovaný izolát Alm138 je zvýrazněn modrou barvou.

Tabulka 11: Porovnání identity izolátu Alm138 s LChV1 izoláty dostupnými v databázi GenBank, hodnoceny kompletní genomy a jednotlivé čtecí rámce. Izoláty označeny příslušnými názvy.

Název izolátu	Celkový genom	ORF 1		ORF 2		ORF 3		ORF 4		ORF 5		ORF 6		ORF 7		ORF 8	
	nt	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
Apr153	76,2	76,6	83,9	70,8	64,5	77,2	83,7	75,0	78,9	73,4	76,7	72,4	72,3	79,7	87,0	78,9	81,1
Apr156	76,5	77,0	84,4	75,0	74,2	78,1	85,3	74,8	78,5	73,1	75,5	72,3	72,6	80,2	86,1	80,6	84,5
Apr161	76,5	76,9	84,2	75,0	74,2	78,1	85,3	74,9	78,3	73,3	75,7	72,5	72,5	80,3	86,1	80,7	84,1
Apr172	76,6	76,8	84,2	74,0	74,2	77,8	84,9	75,7	78,7	73,7	76,2	73,1	74,3	79,5	86,6	81,1	84,1
Apr184R	96,2	96,0	96,2	94,8	96,8	96,9	97,5	97,0	97,3	95,1	92,6	96,2	95,3	97,4	99,1	96,8	96,2
BJ	91,9	92,0	93,8	91,7	87,1	92,8	94,4	91,8	94,6	90,5	89,6	91,0	90,3	93,7	97,4	91,8	89,9
C118-Iso1	73,2	73,5	79,5	79,2	83,9	75,5	82,8	73,6	75,4	70,2	70,3	69,8	67,8	78,3	83,8		
C118-Iso13	77,3	78,4	86,0	78,1	80,6	78,5	84,6	76,1	80,9	72,9	74,5	73,3	74,0	80,0	90,4	83,2	87,0
C118-Iso15	76,1	76,5	83,2	77,1	80,6	78,2	85,3	75,4	78,5	73,2	76,0	72,3	73,1	79,9	86,5	79,6	82,9
FT12	77,7	77,3	84,7	79,2	71,0	80,0	86,9	77,0	78,5	76,6	76,5	73,8	72,2	84,1	92,1	80,0	83,3
FT13	76,5	76,8	84,0	76,0	71,0	78,1	84,8	75,2	77,8	73,3	77,2	72,8	72,6	80,7	87,0	80,6	84,5
FT14	76,4	76,8	84,1	75,0	74,2	78,0	84,8	75,2	78,9	72,8	75,5	72,4	72,3	79,7	86,0	91,3	86,0
G15_3	73,5	73,5	79,4	79,2	83,9	75,7	82,8	73,5	75,4	70,1	70,8	69,9	67,8	78,3	83,8	73,5	70,2
ITMAR	75,6	67,5	68,0	72,9	67,7	77,0	83,7	74,3	78,1	72,8	76,0	71,8	71,4	81,7	89,5	77,2	79,0
Jerte	77,8	77,5	85,1	80,2	67,7	80,3	87,5	76,8	79,3	76,4	76,9	74,1	73,4	83,9	92,1	80,6	85,4
Kyoto-2	92,1	92,0	94,1	93,8	96,8	93,4	94,6	92,2	94,4	90,9	90,6	90,8	90,2	94,4	98,3	91,3	88,7
LV16	78,1	78,1	86,0	80,2	71,0	80,3	87,8	77,1	78,7	76,2	76,5	73,7	71,7	83,9	92,1	80,4	84,5
LV27S1	76,3	76,7	83,2	75,0	71,0	78,2	85,5	75,1	79,1	72,7	76,7	72,8	72,9	82,2	89,0	80,7	84,9
LV27S2	91,1	89,5	90,9	93,8	100	93,7	95,3	93,6	95,7	91,9	90,8	91,2	90,9	94,0	98,9	93,3	96,2
LVV	77,6	77,1	84,3	80,2	67,7	80,3	87,5	76,8	79,3	76,4	77,0	74,1	73,4	83,9	92,1	80,6	85,4
Niagara-A22	77,7	77,3	84,7	79,2	71,0	79,9	86,9	77,1	78,7	76,9	76,9	73,8	72,3	83,9	92,1	80,3	83,7
P8-23	77,8	77,5	84,8	79,2	67,7	80,6	87,5	77,4	79,3	76,4	76,5	74,1	73,2	83,6	92,1	80,4	84,9
P8-42	77,4	78,2	86,2	78,1	74,2	78,6	84,8	77,2	82,2	72,4	74,5	72,5	72,2	83,0	93,9	79,4	82,8
Ponferrada	77,7	77,2	84,3	79,2	71,0	80,2	87,3	77,4	79,1	76,7	76,9	73,7	72,8	84,1	92,1	80,6	84,1
QLD13	77,6	78,3	85,8	77,1	80,6	79,3	84,9	77,4	81,2	72,8	73,5	73,2	72,9	80,8	93,4	82,6	87,0
Taian	77,8	77,3	84,6	79,2	74,2	80,3	87,7	77,1	79,1	76,5	76,7	73,7	72,6	84,8	92,1	81,0	84,5
TAS16	77,6	78,3	85,8	77,1	77,4	80,0	85,7	77,0	80,9	74,5	74,8	72,3	70,2	81,9	95,0	78,5	80,3
UW2	76,2	76,5	83,6	75,0	74,2	77,2	84,0	74,5	78,1	73,0	77,0	72,7	73,1	81,0	89,5	80,3	84,0
V2356	77,6	78,3	85,8	78,1	80,6	78,7	84,9	76,3	81,0	72,9	74,3	73,7	73,7	82,2	93,9	83,5	87,4
YD	77,7	77,4	84,9	78,1	67,7	80,0	86,8	76,9	80,1	75,9	76,5	73,7	74,0	85,2	93,9	80,2	88,7

Legenda: (nt) nukleotidová sekvence, (aa) aminokyselinová sekvence, (ORF) otevřený čtecí rámec, izoláty seřazeny abecedně, aminokyselinové sekvence vyznačeny tučně.

5.3 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza byla provedena v programu MEGA 7.0. K hodnocení příbuznosti Alm138 a dalších LChV1 izolátů byl použit kompletní genom a konzervativní, taxonomicky významné geny pro RdRp, HSP70h a CP (ORF 1a/b, ORF 3 a ORF 5).

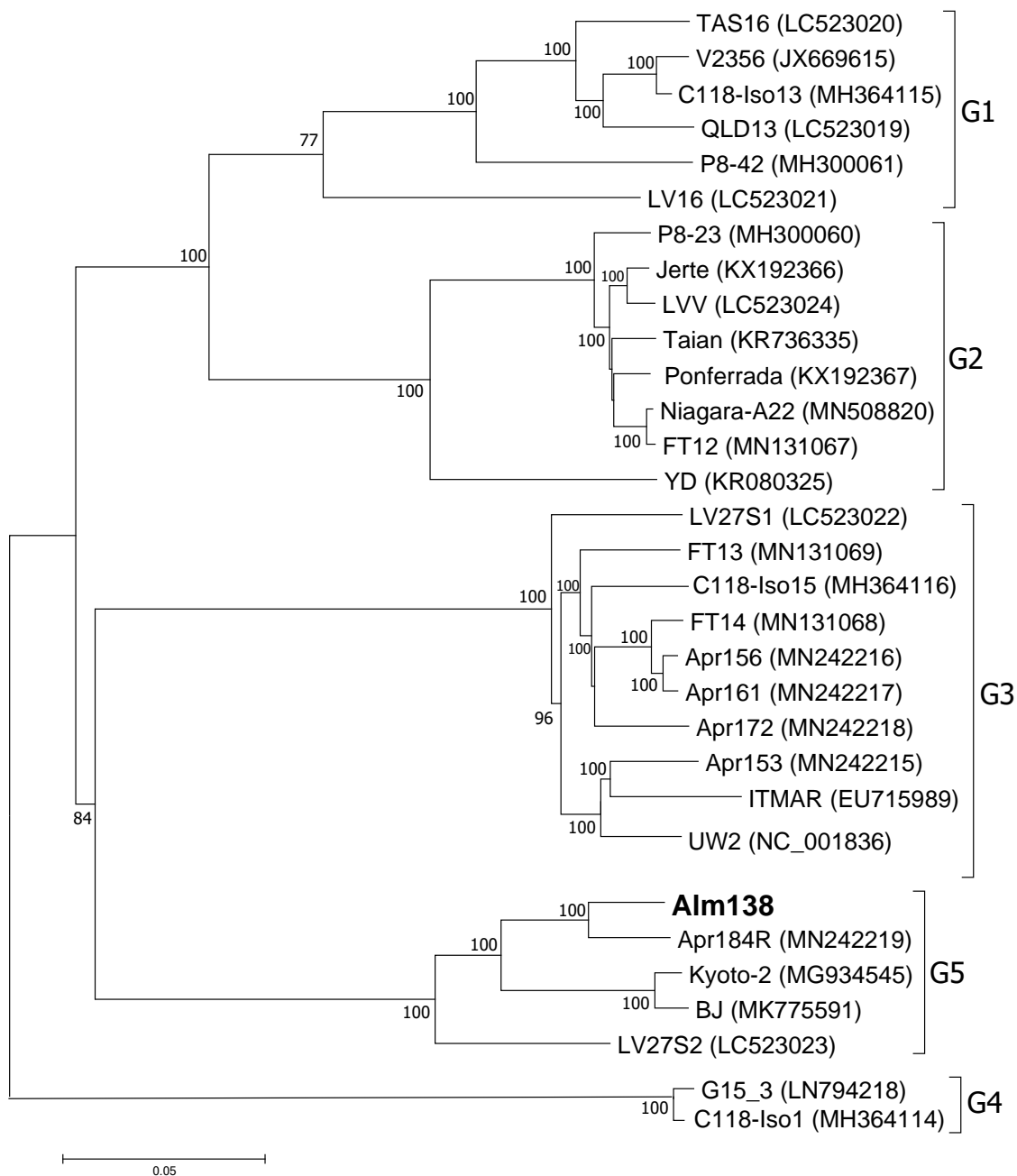
Všechny LChV1 izoláty se vyvětvily do 5 již dříve popsanych fylogenetických skupin G1–G5 (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a), nebyla zaznamenána výraznější změna topologie mezi jednotlivými fylogenetickými stromy pro různé geny. Izolát Alm138 se ve všech případech vyvětvil do skupiny G5, nejpodobnějším izolátem se v této skupině jevil český izolát Apr184R (Acc. No. MN242219) z meruňky obecné. Dále se do této větve zařadil čínský izolát BJ (Acc. No. MK775591) z třešně obecné, japonský izolát Kyoto-2 (Acc. No. MG934545) ze sakury ozdobné a australský izolát LV27S2 (Acc. No. LC523023) z třešně obecné (viz Obrázek 7, 8, 9 a 10). Zjištěná příbuznost potvrzuje podobnost izolátů stanovenou na základě distanční analýzy.

V rámci fylogenetické skupiny G3 vytvořily izoláty Apr153 (Acc. No. MN242215), ITMAR (Acc. No. EU715989) a UW2 (Acc. No. NC_001836) podskupinu průkazně odlišnou od ostatních izolátů G3 skupiny. Ve fylogenetické skupině G2 byla obdobně zaznamenána odlišnost izolátu YD (Acc. No. KR080325), který se vyvětvil od ostatních izolátů této skupiny.

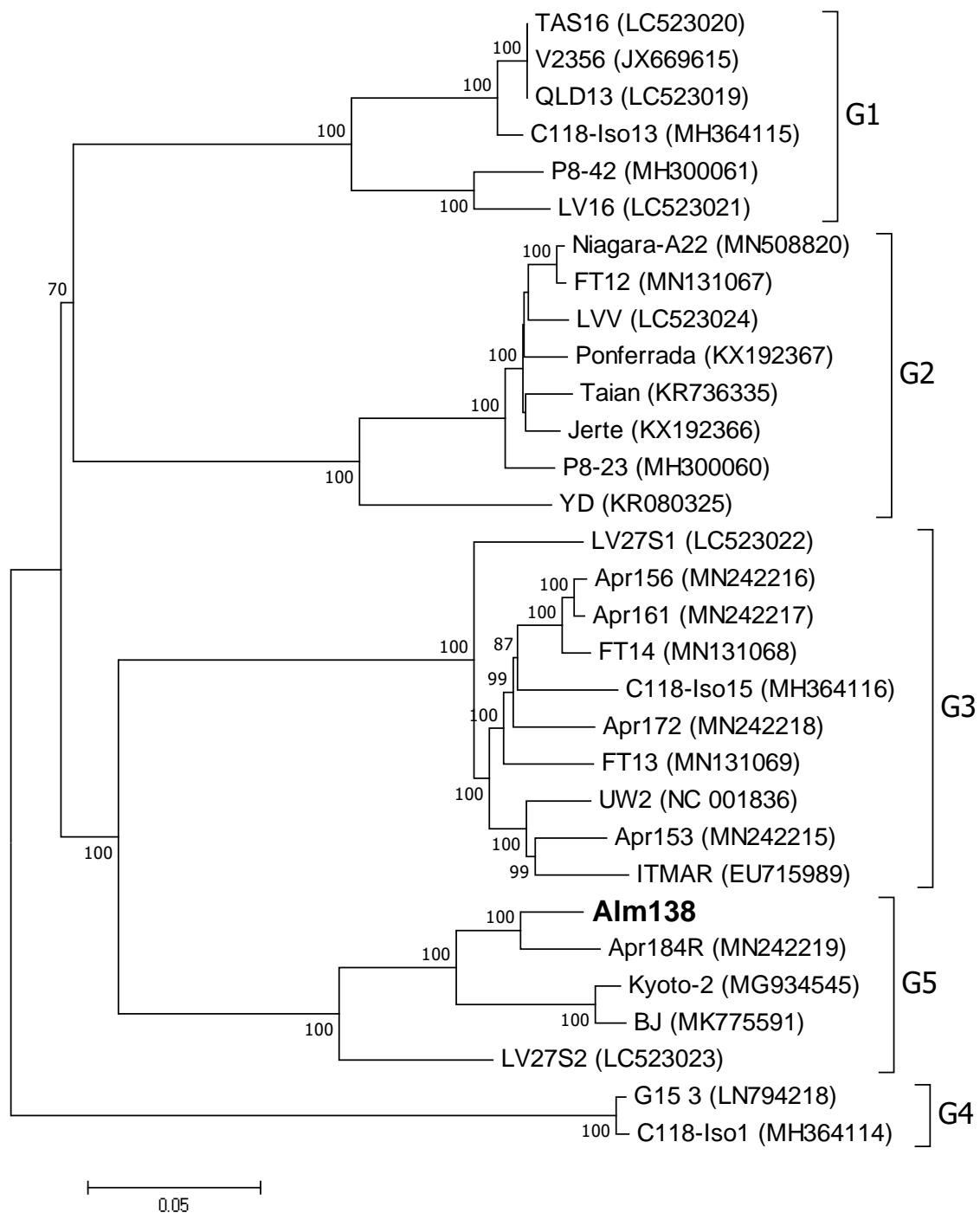
Nejvzdálenější fylogenetická skupina G4, tvořena řeckými izoláty G15_3 (Acc. No. LN794218) a C118-Iso1 (Acc. No. MH364114) z třešně obecné, vytvořila osamocenou větev odlišující se od ostatních fylogenetických skupin.

Australský izolát LV16 (Acc. No. LC523021) z třešně obecné byl v rámci fylogenetické analýzy celého genomu a ORF 1/ab zařazen do fylogenetické skupiny G1. Analýzou genu HSP70h (ORF 3) a CP (ORF 5) byl však zařazen do skupiny G2.

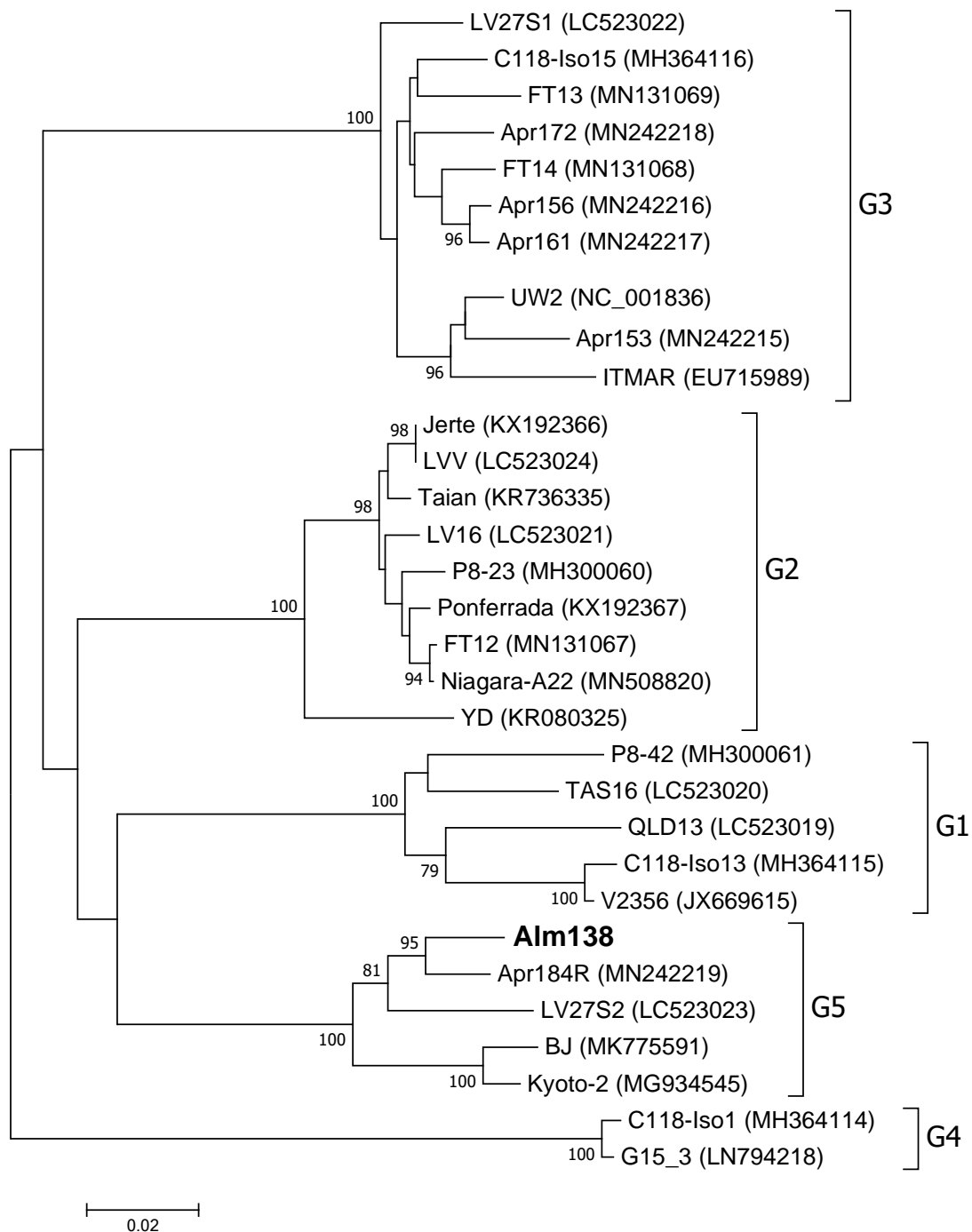
Fylogenetická analýza jak celkových genomických sekvencí, tak jednotlivých taxonomicky významných proteinů RdRp (ORF 1a/b), HSP70h (ORF 3) a CP (ORF 5) 31 little cherry virus 1 izolátů pocházejících ze 4 kontinentů, 12 zemí a 7 hostitelských rostlin (souhrn v tabulce 12), neprokázala žádnou korelaci mezi geografickou ani hostitelskou specifitou.



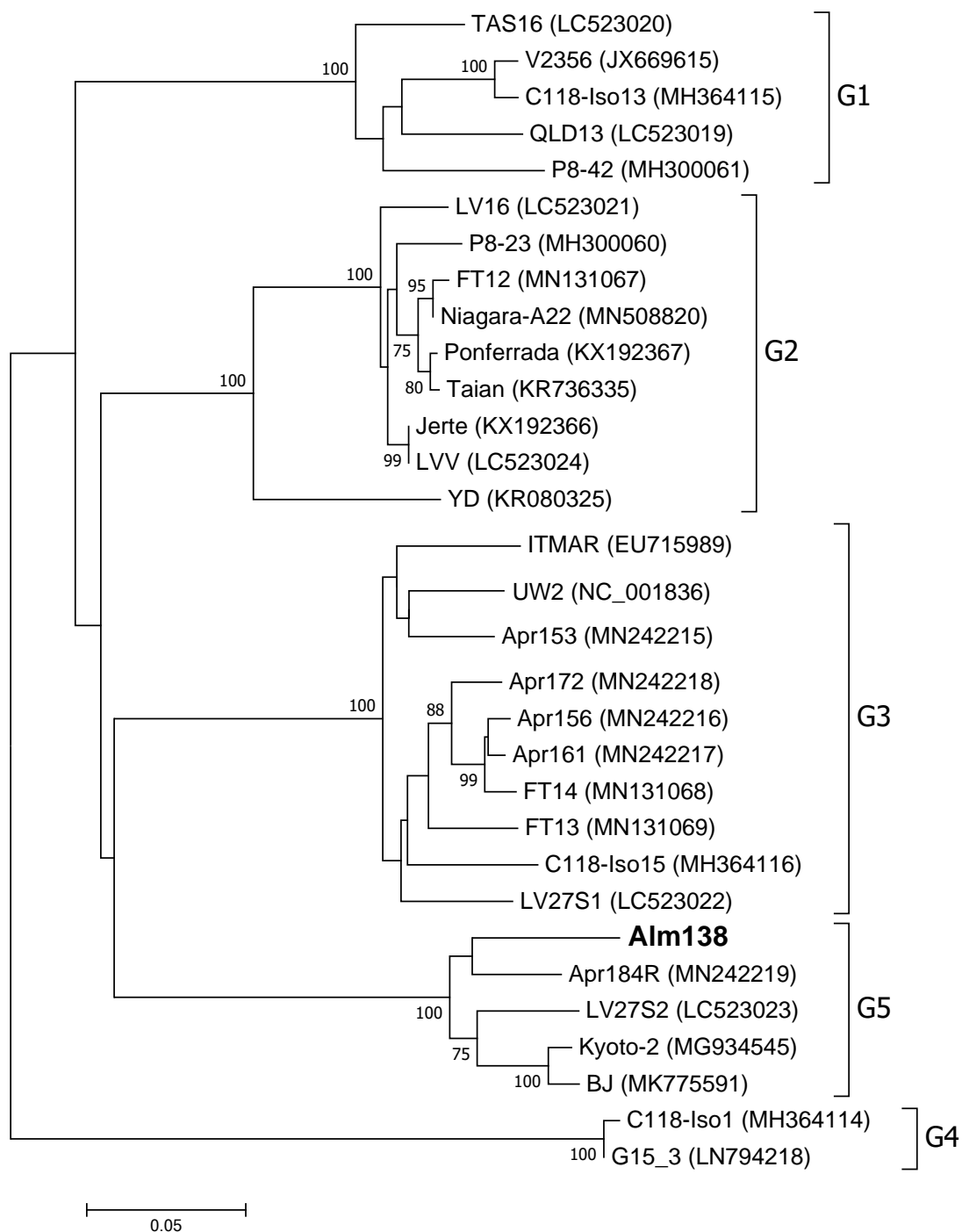
Obrázek 7: Fylogenetický strom genomových sekvencí LChV1 izolátů konstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0). Izoláty označeny názvem a jejich GenBank accession number (v závorce). Studovaný izolát Alm138 je zvýrazněn tučně. Jednotlivé fylogenetické skupiny (G1–G5) jsou označeny svorkou. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.



Obrázek 8: Fylogenetický strom ORF 1a/b aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0). Izoláty označeny názvem a jejich GenBank accession number (v závorce). Studovaný izolát Alm138 je zvýrazněn tučně. Jednotlivé fylogenetické skupiny (G1–G5) jsou označeny svorkou. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.



Obrázek 9: Fylogenetický strom ORF 3 aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0). Izoláty označeny názvem a jejich GenBank accession number (v závorce). Studovaný izolát Alm138 je zvýrazněn tučně. Jednotlivé fylogenetické skupiny (G1–G5) jsou označeny svorkou. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Měřítko představuje 0,02 substitucí na pozici.



Obrázek 10: Fylogenetický strom ORF 5 aminokyselinových sekvencí LChV1 izolátů zkonstruovaný pomocí Neighbor-Joining metody (MEGA 7.0). Izoláty označeny názvem a jejich GenBank accession number (v závorce). Studovaný izolát Alm138 je zvýrazněn tučně. Jednotlivé fylogenetické skupiny (G1–G5) jsou označeny svorkou. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici.

Tabulka 12: Charakteristika LChV1 izolátů použitých ve fylogenetické analýze.

FS*	Izolát	Země původu	Hostitelská rostlina	Reference
G1	C118-Iso13 (MH364115)	Řecko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	LV16 (LC523021)	Austrálie	<i>Prunus avium</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020
	P8-42 (MH300061)	Španělsko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	QLD13 (LC523019)	Austrálie	<i>Prunus domestica</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020
	TAS16 (LC523020)	Austrálie	<i>Prunus avium</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020
	V2356 (JX669615)	Německo	<i>Prunus cerasus</i>	Candresse <i>et al.</i> , 2013
G2	FT12 (MN131067)	USA	<i>Prunus avium</i>	nepublikováno
	Jerte (KX192366)	Španělsko	<i>Prunus avium</i>	Ruiz-Garcia <i>et al.</i> , 2016
	LVV (LC523024)	Austrálie	<i>Prunus avium</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020
	P8-23 (MH300060)	Španělsko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	Ponferrada (KX192367)	Španělsko	<i>Prunus avium</i>	Ruiz-Garcia <i>et al.</i> , 2016
	Niagara-A22 (MN508820)	Kanada	<i>Prunus avium</i>	nepublikováno
	Taian (KR736335)	Čína	<i>Prunus avium</i>	Wang <i>et al.</i> , 2016
	YD (KR080325)	Jižní Korea	<i>Prunus persica</i>	Lim <i>et al.</i> , 2015
G3	Apr153 (MN242215)	Česká republika	<i>Prunus armeniaca</i>	Šafářová <i>et al.</i> , 2020
	Apr156 (MN242216)	Česká republika	<i>Prunus armeniaca</i>	Šafářová <i>et al.</i> , 2020
	Apr161 (MN242217)	Česká republika	<i>Prunus armeniaca</i>	Šafářová <i>et al.</i> , 2020
	Apr172 (MN242218)	Česká republika	<i>Prunus armeniaca</i>	Šafářová <i>et al.</i> , 2020
	C118-Iso15 (MH364116)	Řecko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	FT13 (MN131069)	Švýcarsko	<i>Prunus avium</i>	nepublikováno
	FT14 (MN131068)	USA	<i>Prunus armeniaca</i>	nepublikováno
	ITMAR (EU715989)	Itálie	<i>Prunus cerasus</i>	Matic <i>et al.</i> , 2009a
	LV27S1 (LC523022)	Austrálie	<i>Prunus avium</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020
UW2 (NC_001836)	Německo	<i>Prunus avium</i>	Jelkmann <i>et al.</i> , 1997	
G4	C118-Iso1 (MH364114)	Řecko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	G15_3 (LN794218)	Řecko	<i>Prunus avium</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
G5	Alm138	Česká republika	<i>Prunus dulcis</i>	tato práce
	Apr184R (MN242219)	Česká republika	<i>Prunus armeniaca</i>	Šafářová <i>et al.</i> , 2020
	BJ (MK775591)	Čína	<i>Prunus avium</i>	nepublikováno
	Kyoto-2 (MG934545)	Japonsko	<i>Prunus serrulata</i>	Katsiani <i>et al.</i> , 2018a
	LV27S2 (LC523023)	Austrálie	<i>Prunus avium</i>	Kinoti <i>et al.</i> , 2020

* FS: označení příslušné fylogenetické skupiny.

6 DISKUSE

Little cherry virus 1 je celosvětově rozšířený RNA virus z čeledi *Closteroviridae*, který společně s *Little cherry virus 2* a fytoplazmou Western X-disease způsobuje chorobu little cherry disease dřevin rodu *Prunus*. Viditelné příznaky této choroby, jako je ztráta chuti a zmenšení plodů, červené až bronzové zbarvení listů či zakrnělost celé rostliny, jsou nejčastěji pozorovány pouze u kulturních či okrasných třešní a višní. Infekce jiných zástupců rodu *Prunus*, jako je mandloň obecná, broskvoň obecná, sakura ozdobná, slivoň švestka nebo meruňka obecná, v naprosté většině případů nezpůsobuje žádné viditelné příznaky LChD a jeho přítomnost v rostlině je tak považována za latentní formu infekce. V posledních dvou desetiletích je LChV1 díky zvyšujícímu se počtu hostitelů i rozšiřujícímu se geografickému působení předmětem intenzivního výzkumu ve snaze tomuto viru a jeho etiologii lépe porozumět. U získaných izolátů byla detekována značná genetická variabilita, která byla vysvětlována geografickým původem izolátů. Fylogenetická analýza dostupných izolátů však žádnou spojitost mezi geografickým původem ani rozdílnou hostitelskou rostlinou nepotvrdila (Matic *et al.*, 2007, 2009a; Jelkmann *et Eastwell*, 2011; Candresse *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Šafářová *et al.*, 2017a; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Fuchs *et al.*, 2020; WSU Tree Fruit, 2021).

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na studium molekulárně genetické variability atypického izolátu získaného z příznakové mandloně obecné, jeho analýzu a srovnání s dostupnými LChV1 izoláty v databázi GenBank.

K analýze byly vybrány vzorky ze čtyř stromů mandloně obecné rostoucích v ulici Mandloňová v Horních Věstonicích, z nichž jedna mandloň, u které byla již dříve potvrzena infekce LChV1, vykazovala chlorotickou mozaiku na listech. Tato mandloň byla jediná, u které se potvrdila přítomnost LChV1 použitím specifických primerů 1LC_12776F/1LC_13223R a LCV1U_16390/LCV1L_16809 určených k detekci (Rott *et Jelkmann*, 2001; Glasa *et al.*, 2015). Etiologie LChV1 je stále nejasná, ovšem nepřítomnost viru ve zbylých třech mandloních naznačuje, že k infekci nedošlo prostřednictvím vektoru, protože v opačném případě by s největší pravděpodobností byly díky krátké vzdálenosti mezi stromy infikovány mandloně všechny. Toto zjištění potvrzuje předpoklad, že k infekci velmi pravděpodobně došlo prostřednictvím vegetativního rozmnožování latentně infikované podnože mandloně obecné (Šafářová *et al.*, 2020). Nelze sice zcela jistě potvrdit, že chlorotická mozaika na listech byla

způsobena infekcí LChV1, ale v roce 2017 byla u studovaného stromu vyvrácena přítomnosti viru šarky švestky (Šafářová *et al.*, 2017b) a případné nové a neznámé viry by bylo nutné potvrdit/vyvrátit pomocí NGS. Detekce LChV1 na příznakové mandloni obecné ovšem naznačuje, že infekce nemusí být vždy latentní a že některé genotypy mohou být k nákaze více senzitivní (Šafářová *et al.*, 2020). Tyto potencionálně senzitivního genotypy představují hrozbu pro budoucí pěstování této dřeviny a z tohoto důvodu je důležité tomuto viru co nejvíce zabránit v dalším šíření.

V rámci další části bakalářské práce byla získána kompletní sekvence LChV1 izolátu Alm138 z příznakové mandloně obecné, která byla dlouhá 16 928 bp a obsahovala 8 otevřených čtecích rámců. Počet a uspořádání otevřených čtecích rámců genomu Alm138 byly v souladu s obecným popisem little cherry virus 1, jen v několika případech byly zaznamenány odchylky v jejich délce. Porovnáním kompletní genomové sekvence a nukleotidových a aminokyselinových sekvencí jednotlivých ORF izolátu Alm138 s 30 izoláty dostupných v databázi GenBank byla potvrzena očekávaná vysoká variabilita izolátů little cherry virus 1, dosahujících hodnot až 35,5 %. Nejméně variabilní část genomu byl ORF 3 kódující HSP70h a ORF 7 kódující p21, nejvariabilnější část genomu byl ORF 2 kódující p4. Tato zjištění jsou v souladu se zjištěními Candresse *et al.* (2013) a Katsiani *et al.* (2015, 2018a). Nejvyšší shodu v celogenomické sekvenci (96,2 %) i v sekvencích jednotlivých otevřených čtecích rámců (92,6–99,1 %) vykazoval český izolát Apr184R získaný z 30 let staré meruňky obecné. Odhadované stáří studované mandloně obecné bylo 15 let (Šafářová, osobní sdělení). I přes vysokou identitu je díky věkovému rozdílu a odlišnému původu nepravděpodobné, že by izoláty pocházely ze stejného zdroje infekce.

Fylogenetická analýza nukleotidové sekvence celého genomu a aminokyselinové sekvence ORF 1a/b, ORF 3 a ORF 5 rozdělila 31 izolátů do již dříve vytvořených 5 fylogenetických skupin (Katsiani *et al.*, 2018a). Studovaný izolát Alm138 byl zařazen do skupiny G5 společně s izoláty různého geografického původu, a to z České republiky, Japonska, Austrálie a Číny: Apr184R, Kyoto-2, LV27S2 a BJ. Z fylogenetických stromů nebylo patrné rozdělení izolátů pocházejících ze 4 kontinentů a 7 hostitelských rostlin do skupin ať už na základě hostitelské specifity nebo geografického rozmístění, což je v souladu s předchozími studii (Candresse *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Šafářová *et al.*, 2020).

Podobně jako u izolátů Kyoto-2, G15_3, PHLC28 5, V2356 nebo Taian (Candresse *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015,2018a; Wang *et al.*, 2016) došlo u izolátu Alm138 v oblasti ORF 2 k 'nonsense' substituci thyminu na adenin, což mělo za následek předčasné ukončení translace a vznik o 5 aminokyselin kratšího p4 proteinu než u izolátů, které se ve fylogenetické analýze vyvětvily do skupiny G3: Apr153, Apr156, Apr161, Apr172, C118-Iso15, FT13, FT14, ITMAR, LV27S1 a UW2. Na základě získaných dat lze říct, že absence této mutace je charakteristická pro izoláty řadící se do fylogenetické skupiny G3. K potvrzení této hypotézy jsou nutné další studie zaměřené na charakterizaci většího počtu izolátů patřících do těchto fylogenetických skupin.

HSP70h, kódovaný ORF 3, byl u izolátu Alm138 o 67 aminokyselin kratší než u izolátů ITMAR a UW2. To zapříčinila jednonukleotidová inzerce, která vyústila v předčasné zařazení terminačního kodonu, a tedy vzniku kratšího ORF 3 (Jelkmann *et al.*, 1997; Matic *et al.*, 2009a; Candresse *et al.*, 2013). Tato inzerce je u LChV1 izolátů běžná, kratší produkt třetího otevřeného čtecího rámce byl zaznamenán například u izolátů Apr153, Apr184R, C118-Iso13, G15_3, Jerse, Kyoto-2, Taian nebo V2356 (Candresse *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Ruiz-Garcia *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Šafářová *et al.*, 2020).

Rozdílná délka předpokládaného proteinu byla detekována i v rámci ORF 7. Protein p21, kódovaný ORF 7, byl u izolátu Alm138 o 50 aminokyselin delší než u izolátů ITMAR, UW2, LV27S1 a LV27S2, P8-42, QLD13, TAS16 a V2356. U izolátů s kratším produktem byla detekována inzerce cytosinu v 5' oblasti ORF 7, která měla za následek „posunutí“ pozice iniciačního kodonu o 150 nukleotidů dále (Katsiani *et al.*, 2018a; Kinoti *et al.*, 2020). Protein p21 o stejné délce jako u izolátu Alm138 byl zaznamenán například u izolátů Apr184R, G15_3, Kyoto-2, LV16, Ponferrada, Taian nebo YD (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Lim *et al.*, 2015; Ruiz-Garcia *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Kinoti *et al.*, 2020; Šafářová *et al.*, 2020).

Při analýze sekvencí byl u izolátu G15_3 (Acc. No. LN794218) identifikován alternativní iniciační kodon pro ORF 3 a ORF 5. V obou případech se kodon ATG nachází o 12 nukleotidů dále směrem k 3'-konci, než je kodon TTG původně popsán autory (Katsiani *et al.*, 2015). Nově identifikovaný ORF 3 by kódoval produkty o stejné délce jako Alm138 a dalších 27 studovaných izolátů (mimo ITMAR a UW2). ORF 5 by kódoval produkty o stejné délce jako všechny analyzované izoláty v této práci.

Vysoká podobnost izolátu Alm138 s izoláty z Asie a Austrálie podporuje tvrzení, že se LChV1 šíří globálně společně s infikovaným materiálem mezi komerčními sady (Jelkmann *et al.*, 2011; Jeger *et al.*, 2017). Porovnání identity izolátu Alm138 s izoláty dostupných v databázi GenBank podpořilo tvrzení, že vysoká variabilita LChV1 izolátů není způsobena geografickým původem ani specifitou k hostitelské rostlině (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a). Jedním z možných vysvětlení vysoké variability, která je pro tento virus příznačná, může být rekombinace mezi jednotlivými LChV1 izoláty v průběhu evoluce, i když rekombinantních událostí bylo zatím u současných izolátů detekováno málo, konkrétně u řeckého izolátu No2 ISTO, u italského izolátu ITMAR a u australských izolátů LVV, LV16 a TAS16 (Katsiani *et al.*, 2015, 2018a; Kinoti *et al.*, 2020).

Rozšiřující se okruh hostitelů i geografického rozmístění, absence známého vektoru, neznámá příčina vysoké variability a nejasná epidemiologická situace – to je vyjmenování pouze několika důvodů, proč je důležité LChV1 stále detailně studovat a zaměřit svá úsilí na pochopení a prohloubení našeho poznání.

7 ZÁVĚR

Byla potvrzena infekce mandloně vykazující symptomy little cherry disease virem little cherry virus 1. RT-PCR a Sangerovým sekvenováním byla získána kompletní sekvence LChV1 izolátu Alm138, která byla 16 928 nt dlouhá a obsahovala osm otevřených čtecích rámců. Sekvence vykazovala nejvyšší identitu s českým izolátem získaným z meruňky obecné Apr184R (96,2%), japonským izolátem získaným ze sakury ozdobné Kyoto-2 (92,1 %), čínským izolátem získaným z třešně obecné BJ (91,9 %) a australským izolátem získaným z třešně obecné LV27S2 (91,1 %). Fylogenetickou analýzou pomocí algoritmu Neighbor-Joining se izolát Alm138 vyvětvil do již popsané fylogenetické skupiny G5 společně s již zmíněnými izoláty Apr184R, Kyoto-2, BJ a LV27S2, čímž byla potvrzena evoluční příbuznost těchto izolátů. Analýzou 31 LChV1 izolátů dostupných v GenBank nebyla zjištěna souvislost mezi vysokou variabilitou a geografickou či hostitelskou specifitou.

Přítomnost LChV1 izolátu příbuzným s izoláty původem z Asie a Austrálie v České republice prokazuje dřívější závěry o globálním šíření little cherry virus 1 v infikovaném materiálu. Ze skutečnosti, že byl tento izolát získán z genotypu mandloně senzitivního k LChV1 je patrné, že je potřeba podniknout účinné kroky k zabránění šíření tohoto viru.

8 LITERATURA

- Agranovsky A. A., Koonin E. V., Boyko V. P., Maiss E., Froetschl R., Lunina N. A., Atabekov J. G. (1994): Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology*, 198:311–324.
- Agranovsky A. A. (1996): Principles of Molecular Organization, Expression, and Evolution of Closteroviruses: Over the Barriers. *Advances in Virus Research*, 47: 119–158.
- Agranovsky A. A. (2016): Closteroviruses: Molecular biology, evolution and interactions with cells. In *Plant viruses: Evolution and management*. Edited by Gaur R. K., Petrov N. M., Patil B. and Stoyanova M. I. Singapore, Springer. 231–252.
- Alzhanova D. V., Hagiwara Y., Peremyslov V. V., Dolja V. V. (2000): Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology*, 268: 192-200.
- Alzhanova D. V., Napuli A. J., Creamer R., Dolja V. V. (2001): Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *The EMBO Journal*, 20: 6997–7007.
- Bajet N. B., Unruh T. R., Druffel K. L., Eastwell K. C. (2008): Occurrence of two Little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Disease*, 92: 234–238.
- Bar-Joseph M., Garnsey S. M., Gonsalves D. (1979): The closteroviruses: A distinct group of elongated plant viruses. *Advances in virus research*, 25: 93–168.
- Baráth D., Jaksa-Czotter N., Molnar J., Varga T., Balassy J., Szabo L. K., et al. (2018): Small RNA NGS revealed the presence of cherry virus a and Little cherry virus 1 on apricots in Hungary. *Viruses-Basel*, 10: 318.
- Büttner C., Jelkmann W., Graf H. (1994): Zum Auftreten der Kleinfrüchtigkeit der Süßkirche (little cherry disease) in deutschen Erwersobstanlagen. *Erwerbsobstbau*, 38: 10–13.
- Candresse T., Marais A., Faure C., Gentit P. (2013): Association of *Little cherry virus 1* (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology*, 103: 293–8.

- Dolja V. V., Karasev A. V., Koonin E. V. (1994): Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 261-285.
- Dolja, V. V., Kreuze J. F., Valkonen J. P. (2006): Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res*, 117: 38–51.
- Elena K., Alivizatos A. S., Varveri C. (2008): New plant pathogens reported in Greece, 1990-2007. *Hellenic Plant Protection Journal*, 1: 1–25.
- Farooq A. B., Ma Y. X., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G. P., Hong N. (2013): Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in *Grapevine leafroll-associated virus 3* in China. *Virus Research*, 171: 15–21.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fiore N., Fernandez C., Quiroga N., Pino A. M., Rivera L., Sagredo K., Zamorano A. (2018): First report of *Little cherry virus 1* in Chile. *Plant Disease*, 102: 689–690.
- Foster W., Lott T. (1947). “Little cherry”, a virus disease. *Scientific Agriculture*, 27: 1–6.
- Fry P. R. et Wood G. A. (1970): Little cherry virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 13: 111-118.
- Fuchs M., Bar-Joseph M., Candresse T., Maree H. J., Martelli G. P., Melzer M. J., Menzel W., Minafra A., Sabanadzovic S., and ICTV Report Consortium (2020): ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae, *Journal of General Virology*, 101: 364–365.
- Glasa M., Benediková D., Predajňa L. (2015): First report of Little cherry virus-1 in Slovakia. *Journal of Plant Pathology*, 97: 541–551.
- Isogai M., Aoyagi J., Nakagawa M., Kubodera Y., Satoh K., Katoh T., Inamori M., Yamashita K., Yoshikawa N. (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 288–291.

- Jeger M., Bragard C., Caffier D., Dehnen-Schmutz K., Gilioli G., Gregoire J., Miret J. A. J., MacLeod A., Navarro M. N., Niere B., Parnell S., Potting R., Rafoss T., Rossi V., Urek G., Van Bruggen A., Van der Werf W., West J., Chatzivassiliou E., Winter S., Hollo G., Candresse T. (2017): Pest categorisation of Little cherry pathogen (non-EU isolates). *EFSA Journal*, 15.
- Jelkmann W., Fechtner B., Agranovsky A. A. (1997): Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology*, 78: 2067–2071.
- Jelkmann W., Hergenhahn F., Berwarth C. (2010): Transmission of Little cherry virus-1 (LChV-1) by *Cuscuta europea* to herbaceous host plants. *Mitteilungen - Julius Kühn Institut*, 427: 272–274.
- Jelkmann W., Eastwell K. C. (2011): Little cherry virus-1 and - 2. In Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (Eds). *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 153–159.
- Jelkmann W., Mikona C., Turturo C., Navarro B., Rott M. E., Menzel W., Saldarelli P., Minafra A., Martelli G. P. (2012): Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7. *Archives of Virology*, 157: 359–362.
- Jensen D. D. (1969): Comparative Transmission of Western X-Disease Virus by *Colladonus montanus*, *C. geminatus*, and a New Leafhopper Vector, *Euscelidius variegatus* 1. *Journal of Economic Entomology*, 62: 1147–1150.
- Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Karasev A. V., Hilf M. E., Garnsey S. M., Dawson W. O. (1997): Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5' termini of the citrus tristeza virus subgenomic RNAs. *Journal of Virology*, 71:6233–6236.
- Karasev A. V. (2000): Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 293–324.

- Katsiani A. T., Maliogka V. I., Amoutzias G. D., Efthimiou K. E., Katis N. I. (2015): Insights into the genetic diversity and evolution of Little cherry virus 1. *Plant Pathology*, 64: 817-824.
- Katsiani A., Katsarou K., Kalantidis K., Katis N. I., Maliogka, V. I. (2017): Identification of an RNA silencing suppressor encoded by the genome of Little Cherry Virus 1. In 24th International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops in Greece, Thessaloniki. 5. 6. 2017–9. 6. 2017; p. 113.
- Katsiani A. T., Maliogka V. I., Katis N., Svanella-Dumas L., Olmos A., Ruiz-García A. B., Marais A., Faure Ch., Theil S., Lotos L., Candresse T. (2018a): High-throughput sequencing reveals further diversity of Little cherry virus 1 with implications for diagnostics. *Viruses-Basel*, 10: 385.
- Katsiani A. T., Pappi P., Olmos A., Efthimiou K. E., Maliogka V. I., Katis N. I. (2018b): Development of a Real-Time RT-PCR for the universal detection of LChV1 and study of the seasonal fluctuation of the viral titer in sweet cherry cultivars. *Plant Disease*, 102: 899–904.
- Keim-Konrad R., Jelkmann W. (1996): Genome analysis of the 3′-terminal part of the Little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Archives of Virology*, 141: 1437–1451.
- Kinoti W. M., Nancarrow N., Dann A., Rodoni B. C., Constable F. E. (2020): Updating the quarantine status of *Prunus* infecting viruses in Australia. *Viruses*, 12: 246.
- Komorowska B., Cieslinska M. (2004): First report of Cherry virus A and Little cherry virus-1 in Poland. *Plant Disease*, 88: 909.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Lim S., Igor D., Yoo R. H., Zhao F., Cho I. S., Choi G. S., Lim H. S., Lee S. H., Moon J. S. (2015): Genomic detection and characterization of a Korean isolate of *Little cherry virus 1* sampled from a peach tree. *Virus Genes*, 51: 260–266.
- Lindquist S., Craig E. A. (1988): The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22:631-677.

- Ludvíková H., Suchá J. (2011): First report of Little cherry disease from sweet cherry (*Prunus avium*) and sour cherry (*P. cerasus*) in the Czech Republic. *Disease Notes*, 95: 1197.
- Marais A., Faure C., Theil S., Svanella-Dumas L., Brans Y., Maurice I., Blin V., Candresse T. (2016): First report of Little cherry virus 1 on plum in France. *Plant Disease*, 100: 2544–2545.
- Martelli G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Agranovsky A. A., Al Rwahnih M., Dolja V. V., Dovas C. I., Fuchs M., Gugerli P., Hu J. S., Jelkmann W. (2012): Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94: 7-19.
- Matic S., Myrta A., Minafra A. (2007): First report of Little cherry virus-1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89: S75.
- Matic S., Minafra A., Sanchez-Navarro J. A., Pallas V., Myrta A., Martelli G. P. (2009a): ‘Kwanzan Stunting’ syndrome: detection and molecular characterization of an Italian isolate of little cherry virus 1. *Virus Research*, 143: 61–67.
- Matic S., Minafra A., Boscia D. da Cunha A. T. P., Martelli G. P. (2009b): Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods* 155: 72–76.
- Mekuria T. A., Smith T. J., Beers E., Watson G. W., Eastwell K. C. (2013): First report of transmission of little cherry virus 2 to sweet cherry by *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Plant Disease*, 97: 851.
- Muhire B. M., Varsani A., Martin D. P. (2014): SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS ONE*, 9: e108277.
- Nagar R., Noorani S., Komorowska B., Singh, S. R., Hallan V., Zaidi A. A. (2009): Molecular evidence for little cherry virus 1 infection on cherry in India. *Indian Journal of Virology*, 20: 45.
- Peng C.W. et Dolja V.V. (2000): Leader proteinase of the beet yellows closterovirus: mutation analysis of the function in genome amplification. *Journal of Virology*, 74: 9766–9770.

- Peremyslov V. V., Hagiwara Y., Dolja V. V. (1998): Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus. *Journal of Virology* 72: 5870–5876.
- Pringle C.R. (1996): Virus Taxonomy 1996 — A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Archives of Virology*, 141: 2251–2256.
- Pruitt K. D. *et* Maglott D.R. (2001): RefSeq and LocusLink: NCBI gene-centered resources. *Nucleic Acids Research*, 29: 137–40.
- Raine J., McMullen R. D., Forbes A. R. (1986): Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 6–11.
- Reed J. C., Kasschau K. D., Prokhnovsky A. I., Gopinath K., Pogue G. P., Carrington J. C., Dolja V. V. (2003): Suppressor of RNA silencing encoded by beet yellows virus. *Virology*, 306: 203–209.
- Rott M. E., Jelkmann W. (2001): Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with Little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*, 91: 261–267.
- Rožanov M. N., Koonin E. V., Gorbalenya A. E. (1992): Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the ‘Sindbis-like’ supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 73:2129–2134.
- Ruiz-Garcia A. B., Martinez C., Santiago R., Garcia M. T., de Prado N., Olmos A. (2016): First report of *Little cherry virus 1* (LChV-1) in sweet cherry in Spain. *Plant Disease*, 100: 2340.
- Sabanadzovic S., Ghanen-Sabanadzovic N. A., Rowhani A., Grant J. A., Uyemoto J. K. (2005): Detection of Cherry virus A, Cherry necrotic rusty mottle virus and Little cherry virus 1 in California orchards. *Journal of Plant Pathology*, 87: 173–177.
- Saitou N. *et* Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425.

- Satyanarayana T., Gowda S., Boyko V. P., Albiach-Martí M. R., Mawassi M., Navas-Castillo J., Karasev A. V., Dolja V., Hilf M. E., Lewandowski D. J., Moreno P., Bar-Joseph M., Garnsey S. M., Dawson W.O. (1999): An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:7433-8.
- Satyanarayana T., Gowda S., Mawassi M., Albiach-Martí M. R., Ayllón M. A., Robertson C., Garnsey S. M., Dawson W. O. (2000): Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*, 278: 253–265.
- Satyanarayana T., Gowda S., Ayllón M. A., Dawson W. O. (2004): Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:799–804.
- Serce C. U., Gazel M., Caglayan K. (2011): First report of little cherry virus 1 in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 93: 66.
- Schroeder M. et Petruschke M. (2009): Occurrence of Little cherry virus-1 on *Prunus* ssp. in Baden-Württemberg. In 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 5.–10. 7. 2009 (pp. 58– 59).
- Slykhuis J. T., Yorston J., Raine J., McMullen R. D., Li T. S. C. (1980): Current status of little cherry disease in British Columbia. *Canadian Plant Disease Survey*, 60: 3742.
- Šafářová D., Faure C., Candresse T., Navrátil N., Nečas T., Marais A. (2017a): First report of Little cherry virus 1 infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Disease*, 101: 845.
- Šafářová D., Neoralová V., James D., Navrátil M. (2017b): Almond (*Prunus dulcis* L.) – not a natural host of *Plum pox virus* in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 1163: 123–128.
- Šafářová D., Ševčíková V., Neumanová K., Suchá J., Nečas T., Navrátil M. (2020): Molecular characterisation of little cherry virus 1 infecting apricots in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 158: 83–97.

- Tahzima R., Foucart Y., Peusens G., Belien T., Massart S., De Jonghe K. (2017): First report of *Little cherry virus 1* affecting european plum (*Prunus domestica*) in Belgium. *Plant Disease*, 101: 1557.
- Tahzima R., Qessaou R., Foucart Y., Massart S., De Jonghe K. (2019): First report of little cherry virus 1 infecting apricot (*Prunus armeniaca*) in Morocco. *Plant Disease*, 103: 2975.
- Tamura K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 678–687.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–80.
- Vitushkina M., Fechtner B., Agranovsky A., Jelkmann W. (1997): Development of an RT-PCR for the detection of Little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 803–808.
- Wang J., Zhu D., Tan Y., Zong X., Wei H., Hammond R. W., Liu Q. (2016): Complete nucleotide sequence of little cherry virus 1 (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology*, 161: 749–753.
- Welsh M. F., Cheney P. W. (1976): Little cherry. In: Gilmer R. M., Moore J. D., Nyland G., Welsh M. F., Pine T. S. (ed.): *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*, United States Department of Agriculture, Washington D. C. pp. 231–237.
- Zagrai I., Tahzima R., De Jonghe K., Massart S., & Zagrai, L. (2018). First report on the occurrence of Little cherry virus 1 in Romania. In COST – DIVAS meeting Liège, Belgium, 26.–28.11.2018.
- Zinovkin R. A., Erokhina T. N., Lesemann D. E., Jelkmann W., Agranovsky A. A. (2003): Processing and subcellular localization of the leader papain-like proteinase of beet yellows closterovirus. *Journal of General Virology*, 84:2265–2270.

Online:

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), [online].

Navštíveno: 3. 11. 2020

Dostupné na: <https://talk.ictvonline.org/>

Washington State University Tree Fruit (WSU Tree Fruit), [online].

Navštíveno 1. 2. 2021

Dostupné na: <http://treefruit.wsu.edu/crop-protection/disease-management/little-cherry-disease/>

Viral Zone [online].

Navštíveno 25. 2. 2021

Dostupné na: <https://viralzone.expasy.org/4858>