

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Lucie Šimková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Viry slivoní v kulturním a planém patosystému

Bakalářská práce

Lucie Šimková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucí práce
Mgr. Dany Šafářové, Ph.D a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

SOUHRN

Bakalářská práce je zaměřena na výskyt významných virů slivoní – švestky domácí (*Prunus domestica* L.), myrobalánu (*P. cerasifera* Ehrh.) a trnky obecné (*P. spinosa* L.) v kulturním a planém patosystému.

Teoretická část se zabývá nejprve stručnou charakteristikou zkoumaných druhů rodu *Prunus* a krátce popisuje způsoby detekce rostlinných virů. Dále jsou charakterizovány viry, které se na našem území na slivoních vyskytují, popřípadě hrozí jejich rozšíření do České republiky z jiných států. Konkrétně jde o viry *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *American plum line pattern virus* (APLPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV), *Peach mosaic virus* (PcMV), *Cherry virus A* (CVA), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry rasp leaf virus* (CLRV), *Raspberry ringspot virus* (RRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) a *Tomato black ring virus* (TBRV).

Praktická část je zaměřena na detekci virů slivoní ve vzorcích pocházejících z planě nebo zplaněle rostoucích stromů, švestek, myrobalánů a trnek. Konkrétně byly testovány viry PPV, PDV, PNRSV a viry z čeledi *Betaflexiviridae*. Byla potvrzena přítomnost PPV a ACLSV. *Plum pox virus*, kmen PPV-D, se podařilo detekovat na všech zkoumaných lokalitách v devíti z celkového počtu 28 vzorků, naproti tomu ACLSV byl detekován pouze ve čtyřech vzorcích na dvou lokalitách. Fylogenetická analýza čtyř izolátů ACLSV potvrdila jejich specifitu. PDV ani PNRSV nebyly detekovány v žádném z testovaných vzorků.

SUMMARY

The bachelor thesis is focused on the occurrence of important viruses of plums – plum (*Prunus domestica* L.) myrobalane (*P. cerasifera* Ehrh.) and blackthorn (*P. spinosa* L.) in cultural and wild pathosystem.

The theoretical part at first briefly characterizes target species of *Prunus* genera and describes in short plant virus detection. Then the characterization of viruses follows, the viruses described are those which are known to be present in plums in our region or the risk of their spreading into the Czech Republic exists. Concretely, the aim is concerned to *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *American plum line pattern virus* (APLPV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV), *Peach mosaic virus* (PcMV), *Cherry virus A* (CVA), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Cherry raspleaf virus* (CLRV), *Raspberry ringspot virus* (RRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Tomato black ring virus* (TBRV).

Experimental part is focused on detection and identification of viruses in set of wild growing plums, myrobalan and blackthorn trees coming from three different localities. The tested viruses were PPV, PDV, PNRSV and viruses of the family *Betaflexiviridae*. *Plum pox virus* (strain PPV-D) was detected in all localities tested in nine of 28 samples. *Apple chlorotic ringspot virus* was found to be present only in four samples in two localities. Phylogenetic analysis of these four isolates of ACLSV confirmed their specificity. Neither PDV nor PNRSV were detected in the set of samples tested.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především Mgr. Daně Šafářové, PhD. za odborné vedení, podnětné připomínky, trpělivost a čas, které mi během tvorby bakalářské práce poskytla. Dále děkuji všem ostatním, od nichž se mi dostalo cenných rad při práci v Laboratoři molekulární biologie mikroorganismů. Práce byly financovány Interní grantovou agenturou Univerzity Palackého (IGA_ PrF_2014004) a probíhaly v rámci COST FA1104 – Udržitelná produkce třešní na Evropském trhu.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Charakteristika rodu <i>Prunus</i>	11
3.1.1	Taxonomické zařazení	11
3.1.2	Vybraní zástupci	11
3.1.3	Produkce v ČR	12
3.1.4	Rostlinný materiál jako zdroj infekce	13
3.2	Charakteristika virů infikujících slivoně	13
3.2.1	Rostlinné viry a jejich detekce	13
3.2.2	Čeleď <i>Potyviridae</i>	16
3.2.2.1	<i>Plum pox virus</i> , PPV	16
3.2.3	Čeleď <i>Bromoviridae</i>	19
3.2.3.1	<i>Prune dwarf virus</i> , PDV	19
3.2.3.2	<i>Prunus necrotic ring spot virus</i> , PNRSV	19
3.2.3.3	<i>Apple mosaic virus</i> , ApMV	20
3.2.3.4	<i>American plum line pattern virus</i> , APLPV	20
3.2.4	Čeleď <i>Betaflexiviridae</i>	20
3.2.4.1	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> , ACLSV	21
3.2.4.2	<i>Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus</i> , APCLSV	21
3.2.4.3	<i>Peach mosaic virus</i> , PcMV	21
3.2.4.4	<i>Cherry virus A</i> , CVA	22
3.2.5	Čeleď <i>Secoviridae</i>	22
3.2.5.1	<i>Arabis mosaic virus</i> , ArMV	233
3.2.5.2	<i>Cherry rasp leaf virus</i> , CLRV	23
3.2.5.3	<i>Raspberry ringspot virus</i> , RRSV	23
3.2.5.4	<i>Tomato ringspot virus</i> , ToRSV	24
3.2.5.5	<i>Tomato black ring virus</i> , TBRV	24
4	MATERIÁL A METODY	25
4.1	Biologický materiál	25
4.2	Metody	25
4.2.1	Izolace RNA	25

4.2.2	Detekce viru šarky švestky (PPV).....	27
4.2.3	Detekce PDV.....	30
4.2.4	Detekce PNRSV.....	30
4.2.5	Detekce virů čeledi <i>Betaflexiviridae</i>	32
4.2.6	Elektroforetická separace.....	34
4.2.7	Sekvenování.....	354
4.2.7.1	Izolace PCR produktu z gelu.....	35
4.2.7.2	Sekvenační značení.....	36
4.2.7.3	Analýza sekvencí.....	37
4.3	Použité chemikálie a roztoky, přístrojové vybavení.....	38
4.3.1	Použité chemikálie a roztoky.....	38
4.3.2	Přístrojové vybavení.....	39
5	VÝSLEDKY.....	40
5.1	Detekce PPV.....	40
5.2	Detekce PDV.....	43
5.3	Detekce PNRSV.....	43
5.4	Detekce virů čeledi <i>Betaflexiviridae</i>	44
6	DISKUZE.....	47
7	ZÁVĚR.....	49
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

1 ÚVOD

Slivoně, zejména švestka domácí (*P. domestica* L.), jsou významnými hospodářskými plodinami mírného pásma. Virové infekce, především šarka švestky způsobovaná virem *Plum pox virus*, devastují stromy v kulturních výsadbách a často tak výrazně snižují úrodu a kvalitu sklizených plodů.

Projevy virového onemocnění se u peckovin mohou značně lišit v závislosti na kultivaru, dané konkrétní populaci viru a vnějších podmínkách. Příznaky jsou patrné zejména na listech v podobě světle zelené až nažloutlé mozaiky, teček či skvrn, mnohdy i nekrotických. Viry mohou způsobovat také zakrslý vzrůst, snížení celkové vitality hostitelského stromu až jeho úhyn. Plody z napadených stromů bývají částečně či zcela znehodnocené. Viry se šíří vegetativně, řada z nich také vektory, kterými mohou být různé druhy hmyzu a jiní bezobratlí. Z těchto skutečností je zřejmá nutnost preventivních opatření, zejména používání výsadbového a množitelského materiálu, který byl testován a shledán viruprostým.

V rámci literárního přehledu této práce je uveden stručný popis zkoumaných druhů slivoní, charakteristika jejich nejvýznamnějších virů a obecné způsoby detekce rostlinných virů. Experimentální část pojednává o detekci virů slivoní významných pro Českou republiku, přičemž přítomnost těchto virů byla zkoumána ve zplanělých a planých patosystémech.

2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma „Viry slivoní v kulturním a planém patosystému“
- Detekce a identifikace virů ve vybraném souboru vzorků odebraných v produkčních výsadbách a z planě rostoucích stromů slivoní

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika rodu *Prunus*

Rod *Prunus* je rozsáhlým rodem opadavých, vzácně stálezelených dřevin stromovitého či keřovitého vzrůstu se střídavými listy, které bývají jednoduché s pilovitým okrajem. Květy vyrůstají jednotlivě, popřípadě ve svazečcích nebo hroznech, jejich barva se pohybuje od bílé po červenou. Plodem je obvykle masitá jednosemenná peckovice kulovitého či elipsoidního tvaru. Jedná se o velmi nepřehledný taxon, který bývá někdy dělen do více samostatných rodů. Na severní polokouli je známo přibližně 300 druhů rodu *Prunus*, mezi něž patří velké množství ovocných dřevin, které se významně podílejí na zemědělské produkci, jako například třešeň obecná (*Prunus avium*), meruňka obecná (*P. armeniaca*), slivoň švestka (*P. domestica*), mandloň obecná (*P. dulcis*) nebo broskvoň obecná (*P. persica*) (Horáček, 2007). Tato práce je zaměřena na slivoně neboli tzv. modré prunusy, do nichž jsou řazeny následující druhy: slivoň švestka (*P. domestica*), myrobalán (*P. cerasifera*) a slivoň trnka (*P. spinosa*).

3.1.1 Taxonomické zařazení

Z hlediska taxonomického zařazení je rod *Prunus* součástí čeledi růžovité (*Rosaceae*), třídy dvouděložných rostlin (*Magnoliopsida*), jež patří do oddělení krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*).

3.1.2 Vybraní zástupci

Slivoň švestka (*Prunus domestica* L.)

Slivoň švestka, nebo také švestka domácí, je významným, 3 až 10 m vysokým ovocným stromem s eliptickými až podlouhlými listy, které jsou v dospělosti ze spodní strany jemně chlupaté. Květy rostou samostatně nebo ve svazcích po 2 – 4, zbarveny jsou bíle a objevují se zpravidla v dubnu ještě před olistěním. Plody bývají vejčité, modré, modročerné nebo fialové barvy. Masitá dužina má obvykle sladkou chuť (Horáček, 2007). V České republice je vysazována v rámci zemědělské produkce, sklizeň může být rovnou prodávána, popřípadě použita na výrobu džemů, sušeného ovoce i alkoholu. Stromy ponechané v bývalých sadech či zahradách zplaňují. Jedná se o hexaploida vzniklého pravděpodobně mezidruhovým křížením, $2n=48$ (Crane a Lawrence, 1947).

Slivoň trnka (*Prunus spinosa* L.)

Slivoň trnka, nebo také trnka obecná, je většinou opadavý keř (1 – 4 m), výjimečně strom dorůstající výšky až 8 m. Keřovitá forma bývá hustě větvená. Listy jsou vejčitého, až eliptického tvaru, na okrajích vroubkované. Slivoň trnka kvete v březnu a dubnu malými bílými květy, má kulaté plody o průměru 1 až 2 cm, barva fialová až modročerná, kyselé chuti (Horáček, 2007). Trnka není ekonomicky využívána, roste planě téměř na celém území České republiky, zejména v teplejších oblastech, je možné ji nalézt především na křovinatých stráních, při okrajích lesů, na mezích a podél cest (botany.cz).

Myrobalán (*Prunus cerasifera* Ehrh.)

Myrobalán, nebo také slivoň třešňová, je opadavá dřevina keřovitého či stromovitého vzrůstu (4 – 8 m). Má vejčité až oválné listy a bílé, někdy růžové květy, které se objevují před listy – v březnu až dubnu. Plody jsou kulovité, žluté, červené nebo modré barvy. Na našem území je pěstována jako okrasná rostlina v sadech, nebo zahrádkáři pro své sladké plody, snadno zplaňuje (Horáček, 2007). Je využívána také jako podnož pro slívy a meruňky (Llácer a Cambra, 2006).

3.1.3 Produkce v ČR

V České republice je slivoň švestka významným ovocným stromem v zemědělské produkci a její pěstování má dlouholetou tradici. Po jablkách představuje druhou nejvýznamnější komoditu ovocnářské produkce v ČR. Výměra švestkových sadů za poslední 4 roky vzrostla z 1 811 ha (rok 2010) na 2 126 ha (2014), a počet stromů (švestky pravé) u velkopěstitelů i malopěstitelů se od roku 2007 pohybuje kolem 2,1 milionů (viz Tabulka 1). Celková sklizeň švestek kolísá v závislosti na klimatických podmínkách a zájmu odběratelů v letech 2007 – 2013 kolem 18 000 t, viz Tabulka 2.

Tabulka 1: Počet stromů švestek v ČR (v mil. ks) (podle Buchtová, 2014)

Rok	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Švestky pravé	2,148	2,088	2,109	2,113	1,967	2,141	2,158
Ostatní švestky, slívy, renklódy	1,394	1,427	1,348	1,288	1,426	1,446	1,255

Tabulka 2: Celková sklizeň švestek v ČR (Buchtová, 2014)

Rok	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Švestky pravé [t]	19 042	16 427	24 211	14 135	17 382	14 811	20 134
Ostatní švestky, slívy, renklódy [t]	14 367	13 494	17 815	9 943	12 039	10 438	11 551

3.1.4 Rostlinný materiál jako zdroj infekce

Výskyt a šíření rostlinných virů v ovocných sadech má za následek značné ekonomické ztráty. Proto je množení výsadbového materiálu a produkce zdravých certifikovaných stromů určených k prodeji kontrolováno úředními orgány (Státní rostlinolékařská správa – SRS, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský – ÚKZÚZ). Do prodeje se mohou dostat pouze rostliny, které byly testovány na přítomnost virů, viroidů, fytoplazem a ostatních škůdců napadajících daný druh, a byly shledány zcela zdravými. Slivoň švestka je testována na přítomnost následujících virů: ACLSV, ApMV, CGRMV, MLRSV, PPV, PDV, PNRSV, SLRSV, TBRV. K detekci patogenů se v souladu s legislativními opatřeními využívá zejména inokulace dřevitých i bylinných indikátorů, test ELISA a molekulární metody (EPPO, 1990).

3.2 Charakteristika virů infikujících slivoně

3.2.1 Rostlinné viry a jejich detekce

Rod *Prunus* obsahuje celosvětově více než 400 různých druhů ovocných, planě rostoucích i okrasných dřevin, což se odráží v rozsáhlém počtu patogenů, potažmo také virů infikujících tuto skupinu rostlin. Napadené rostliny většinou vykazují typické příznaky virové infekce, které se objevují zejména na mladých listech. Změny však mohou být pozorovatelné také na jiných částech rostliny. Listy bývají skvrnitě, pokroucené, zakrslého vzrůstu, objevuje se chlorotická mozaikovitost, popřípadě i perforace. Virová infekce může mít za následek opožděné, nebo naopak předčasné kvetení, ovlivňuje kvalitu i dozrávání plodů a nezřídka zhoršuje celkový stav rostliny. Symptomy se mohou často velmi lišit v závislosti na kmenu a konkrétním izolátu viru, genotypu hostitelské rostliny a vnějších podmínkách (Uyemoto a Scott, 1992).

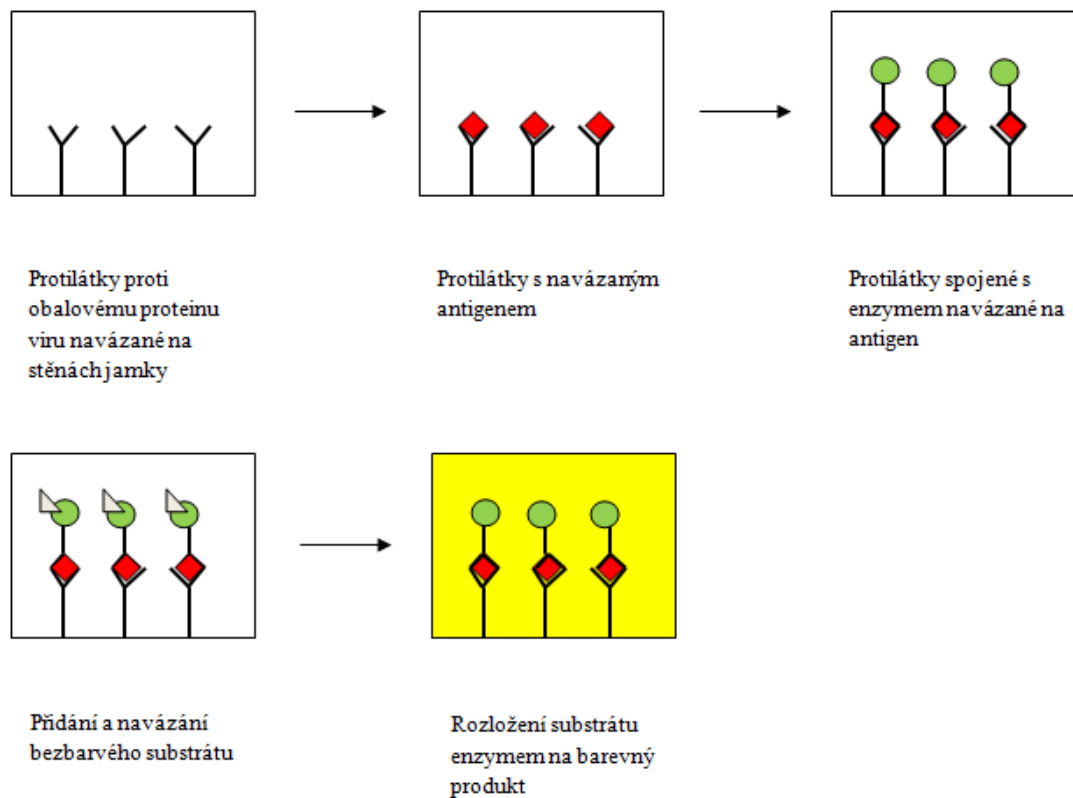
Vysoká genetická variabilita je charakteristickou vlastností virů a souvisí s jejich potřebou přežít v neustávajícím boji virus-hostitel. I RNA viry napadající rod *Prunus* tedy využívají všechny známé způsoby zvyšování genetické variability (Domingo a Holland, 1997). Zejména vysoká frekvence mutací (nejvyšší frekvence mezi veškerými živými organismy) a rekombinací, přeuspořádání genomu a extrémně krátká generační doba zajišťuje neustálý vznik mutantních klonů (Jridi a kol., 2006), které se dále množí a vznikají geneticky variabilní populace téhož virového druhu, tzv. 'quasispecies'. Jejich vývoj velmi závisí na velikosti původní populace, která infikovala hostitelskou rostlinu.

Rostlinné viry mohou být detekovány několika způsoby. Nejjednodušší, ale také nejvíce zavádějící, je pozorování příznaků na zkoumaných rostlinách. Doporučovanými způsoby detekce jsou v dnešní době molekulární a sérologické metody a detekce pomocí biologických indikátorů (García a kol., 2014).

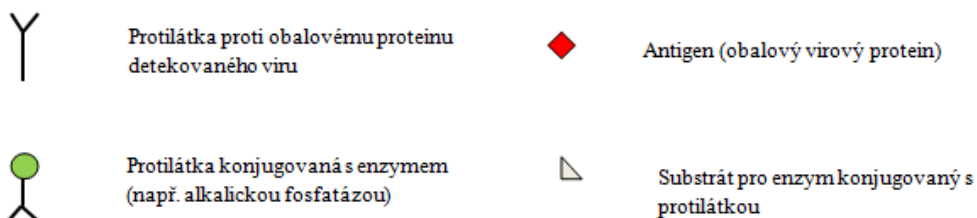
Jako biologické indikátory jsou využívány takové druhy rostlin, u nichž je empiricky zjištěn výskyt typických příznaků. Během produkce výsadbového materiálu jsou používány dřevinné indikátory pro kontrolu kandidátních rostlin na matečnice. Metoda spočívá v naočkování roubu z testované rostliny na indikátorovou rostlinu. Dřevinných indikátorů je celá řada, například semenáče broskvoně (*P. persica* GF305), odrůda švestky domácí 'Ersingerská' či višně plstnatá (*P. tomentosa*). Testy na dřevinných indikátorech jsou zdoluhavé, trvají minimálně 2 roky. Bylinné indikátory jsou využívány jako doplněk jiných diagnostických metod. Mezi bylinné indikátory patří například merlík čilský (*Chenopodium quinoa*, Willd.), okurka setá (*Cucumis sativus*, L.), tykev velkoplodá (*Cucurbita maxima*, Duch.), tabák (*Nicotiana clevelandii*, Gray) či petúnie (*Petunia hybrida*, Vilm.) (EPPO, 1990).

Nejrozšířenějším laboratorním testem je tzv. ELISA test ('Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay'), což je sérologická metoda využívající specifické reakce protilátky a antigenu (v tomto případě obalový virový protein). Protilátky, obvykle získávané z krve imunizovaného živočicha (králíci, myši), jsou navázány na stěny jamek mikrotitrační desky. Do těchto jamek jsou poté naneseny vzorky. Pokud je daný virus přítomen, naváže se na protilátky upevněné na stěnách jamky. Po promytí jsou do jamek desky naneseny protilátky s navázaným enzymem, které nasedají na antigen. Pokud virus přítomen není, jsou protilátky s enzymem odstraněny během následného, konečného promývání. V posledním kroku je do jamek pipetován substrát pro daný enzym, který tento substrát specificky rozloží a zviditelní tak barevnou reakcí pozitivní vzorek (schéma, viz Obrázek 1).

Obrázek 1: ELISA – schéma



Legenda:



Ve výzkumných i detekčních laboratořích jsou vedle ELISA testu hojně využívané molekulární metody, zejména polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace. Princip PCR spočívá v namnožení krátkého úseku DNA ohraničeného specifickými primery. V případě RNA virů je PCR prováděna s cDNA vytvořenou během reverzní transkripce. Produkty PCR jsou na základě své velikosti (molekulové hmotnosti) separovány v průběhu gelové elektroforézy vlivem stejnosměrného elektrického proudu a následně detekovány.

3.2.2 Čeleď *Potyviridae*

Čeleď *Potyviridae* je skupinou virů infikujících rostliny. Zahrnuje celkem 7 rodů, včetně nejobsáhlejšího rodu rostlinných virů – rod *Potyvirus* (Fauquet a kol., 2005). Jediný potyvirus, který napadá prunusy je virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) (Damsteegt a kol., 2007).

Virové částice zástupců čeledi *Potyviridae* jsou neobalené a vláknité. Jejich délka se pohybuje mezi 650 a 900 nm a průměr činí 11 – 15 nm. Zástupci většiny rodů této čeledi, včetně rodu *Potyvirus*, mají genom tvořen jedinou molekulou jednovláknové pozitivně orientované RNA o délce 9,3 až 10,8 kb (King a kol., 2011).

Zástupce této čeledi, který bude v následujícím textu charakterizován – *Plum pox virus* – je virus s velice významným ekonomickým dopadem. Velká část sklizně peckovin, zejména švestek, je neprodejná kvůli výskytu příznaků infekce na plodech. Odhadované finanční ztráty spojené s tímto onemocněním činí za posledních 30 let globálního výskytu 10 miliard euro. Do tohoto odhadu jsou započítány také výdaje na průzkum rozšíření, kontroly sadařského materiálu a různé programy na vymýcení šarky švestky (Cambra a kol., 2006). V boji proti této ničivé chorobě hraje velkou roli výzkum, který přináší nové informace o vlastnostech původce onemocnění, možnostech jeho detekce, způsobu přenosu, hostitelském okruhu a možných opatřeních proti dalšímu šíření.

3.2.2.1 *Plum pox virus*, PPV

Virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV) je řazen do rodu *Potyvirus* a způsobuje jedno z nejvíce devastujících onemocnění peckovin – šarku švestky. Virus šarky švestky napadá veškeré kulturní ovocné druhy peckovin z rodu *Prunus* (Llácer a Cambra, 2006). Kromě toho přirozeně infikuje také řadu okrasných a planých druhů, které se stávají rezervoárem viru a představují tak zdroj šíření na druhy ovocné (James a Thompson, 2006). K PPV jsou vnímavé i mnohé bylinné druhy, z nichž některé jsou hojně využívány ve výzkumných laboratořích. Příkladem může být *Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana*, *Pisum sativum* nebo *Chenopodium foetidum* (Llácer, 2006).

Šarka švestky je široce rozšířena, dosud nebyla zaznamenána pouze v Austrálii, na Novém Zélandu, v Jižní Africe a Kalifornii (EPPO, 2013). Nejvíce postiženými oblastmi je střední a východní Evropa – v Bulharsku, České republice, Slovensku, Maďarsku, Moldavsku, Rumunsku, Srbsku, Bosně a Hercegovině, Chorvatsku, Polsku a Německu se tento virus vyskytuje na celém území nebo ve většině oblastí (Jarausch, 2006; Jevremović a Paunović,

2014; Dulic-Markovic a Jevremović, 2006; Kölber a Neméth, 2001; Malinowski, 2006; Matić a kol., 2006; Mikec a kol., 2006; Varveri, 2006).

Příznaky šarky švestky se mohou objevit na listech, okvětních lístcích, plodech i peckách, přičemž jejich intenzita se liší podle PPV kmenu, druhu infikované dřeviny, lokality a ročního období. Nejpatrnější jsou symptomy zjara na mladých listech. Typickými příznaky infekce jsou světle zelené mozaiky, chlorózy ve formě proužků, teček či kroužků. Příznaky jsou obzvláště viditelné, pokud přidržíme list proti světlu. Plody napadených stromů mohou být deformovány. Objevují se na nich skvrny a kroužky, které bývají světlé, ale mohou i hnědnout až nekrotizovat (EPPO, 2004). Vzhled ani chuť takto postižených plodů nejsou uspokojivé, čímž se i velká část úrody může stát neprodejnou. Alkohol vyrobený z takových plodů mívá nepříjemnou příchut'. Symptomatické plody také často předčasně opadávají (Llácer a Cambra, 2006). Nepříjemná chuť plodů může být u vnímavých odrůd způsobena zvýšeným obsahem organických kyselin a sníženým obsahem cukrů, jak bylo zjištěno na silně vnímavé odrůdě švestky domácí 'Požegača' infikované kmenem PPV-Rec (Usenik a kol., 2015). Typické příznaky infekce virem PPV jsou patrné na Obrázku 2.

Obrázek 2: Příznaky šarky švestky na listech a plodech švestky (foto: D. Šafářová)



PPV se šíří na dlouhé vzdálenosti infikovaným rostlinným materiálem (podnožemi, rouby). Lokálně je přenášen hmyzími vektory, a to zejména různými druhy mšic, konkrétně v České republice to jsou mšice broskvoňová (*Myzus persicae*, Sulzer), mšice švestková (*Hyalopterus pruni*, Geoffroy), mšice slívová (*Brachycaudus helichrysi*, Kaltenbach), mšice bodláková

(*Brachycaudus cardui*, L.), mšice chmelová (*Phorodon humuli*, Schrank) a mšice vojtěšková (*Aphis craccivora*, Koch) (Navrátil a Šafářová, 2015).

V současné době je známo 9 kmenů viru šarky švestky, z nichž nejvíce rozšířené jsou kmeny PPV-D, M a Rec (García a kol., 2014).

Nejprve byly identifikovány kmeny PPV-D (Dideron) a PPV-M (Marcus) za použití polyklonálních protilátek (Kerlan a Dunez, 1979). PPV-D je široce rozšířen na švestkách a meruňkách, PPV-M pak hlavně na broskvoních, ale také na meruňkách (García a kol., 2014). PPV-D naopak broskvoně běžně nenapadá (Candresse a kol., 1998). U kmenu PPV-M objevena existence dvou fylogenetických větví, jedna pocházející ze Středomoří (PPV-Ma) a druhá ze střední a východní Evropy (PPV-Mb) (Dallot a kol., 2011).

Rekombinantní kmen (PPV-Rec) nebyl dlouhou dobu detekován, neboť je sérologicky nerozlišitelný od PPV-M. Vznikl rekombinací mezi kmeny PPV-D a PPV-M, přičemž rekombinační zlom byl lokalizován v oblasti genu P3 (Glasa a kol., 2004).

V průběhu studia PPV byly popsány další, většinou minoritní kmeny viru šarky švestky. Kmen PPV-EA (El Amar) byl objeven v Egyptě (Wetzel a kol., 1991) a nehraje v epidemiologii PPV větší roli. Kmen PPV-T (Turkey) byl detekován prozatím pouze v Turecku, poblíž Ankary na švestkách a meruňkách (Serçe a kol., 2009) a nově v Albánii (Palmisano a kol., 2015). PPV-C (Cherry) byl popsán jako první kmen napadající třešně a višně (Kalashyan a kol., 1994). Kmen PPV-CR (Cherry Russian), taktéž infikující třešně a višně, byl popsán v Rusku (Chirkov a kol., 2013; Glasa a kol., 2013). Kmen PPV-W (Winona) byl popsán v Kanadě (James a kol., 2003) a později byla jeho přítomnost potvrzena v Litvě (Glasa a kol., 2011) a Rusku (Sheveleva a kol., 2012). Nejnověji detekovaný je kmen je PPV-An (Palmisano a kol., 2012).

V České republice byla zatím potvrzena přítomnost pouze tří nejrozšířenějších kmenů – PPV-D, PPV-M a PPV-Rec (Navrátil a Šafářová, 2015). Na celém území je nejvíce zastoupen kmen PPV-D infikující zejména švestky, ale také myrobalány a meruňky (Navrátil a kol., 1998; Gadiou a kol., 2008). PPV-M má rozsáhlý výskyt na jižní Moravě v broskvoňových sadech, také se zde objevuje na meruňkách a sporadicky na myrobalánech nacházejících se v okolí infikovaných broskvoňových sadů (Šafářová a kol., 2011). PPV-Rec byl zatím detekován pouze na jižní Moravě, kde se vyskytuje masivně ve dvou švestkových sadech, odkud se pomalu šíří (Gadiou a kol., 2008; Šafářová a kol., 2012).

3.2.3 Čeleď *Bromoviridae*

Čeleď *Bromoviridae* je čeledí rostlinných virů. Slivoně bývají napadány viry z rodu *Illavirus*, jednoho z šesti rodů patřící do této čeledi – konkrétně viry *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple mosaic virus* (ApMV) a *American plum line pattern virus* (APLPV) (Fauquet a kol., 2005).

Virové částice zástupců čeledi *Bromoviridae* jsou neobalené, sférického nebo baciliformního tvaru o průměru přibližně 30 nm. Genom se skládá ze tří jednovláknových pozitivně orientovaných molekul RNA označovaných jako RNA1, RNA2 a RNA3, z nichž každá je obalena vlastní kapsidou (Fauquet a kol., 2005). Délka genomických RNA virů rodu *Illavirus* se pohybuje od 1,6 do 3,5 kb (Di Terlizzi a kol., 2001; Guo a kol., 1995; Pallás a kol., 2012; Rampitsch a Eastwell, 1997; Sánchez-Navarro a kol., 1997; Shiel a Berger, 2000; Shiel a kol., 1995).

Zástupci rodu *Illavirus* byli považováni za latentní viry, což vyústilo v podcenění jejich významu coby patogenů ovocných stromů. Nicméně je faktem, že mohou působit znatelné ekonomické ztráty – zejména PDV a PNRSV, které ve směsné infekci způsobují u broskvoní tzv. peach stunt disease a výrazně snižují výnos z napadených stromů (Uyemoto a Scott, 1992).

3.2.3.1 *Prune dwarf virus, PDV*

Virus zakrslosti slivoně (*Prune dwarf virus, PDV*) přirozeně infikuje zástupce rodu *Prunus*, zejména se objevuje u třešní a višní (Pallás a kol., 2012). Jeho rozšíření je rozsáhlé, vyskytuje se v oblastech mírného pásma, kde jsou pěstovány prunusy (Adams a Antoniw: DPVWeb). Mezi příznaky způsobované infekcí PDV patří chlorózy a nekrózy listů. Název byl odvozen od deformace listů a zakrslého vzrůstu způsobeného tímto virem na švestce domácí (Uyemoto a Scott, 1992). PDV se ale často vyskytuje ve směsné infekci s jinými viry, takže je obtížné popsat symptomy, které jsou způsobeny právě jen PDV (Fry a Wood, 1971). K přenosu viru dochází infikovaným rostlinným materiálem (rouby) (Diekmann a Putter, 1996), ale také pylem a semeny (Greber a Teakle, 1992; Mink, 1993). V České republice byl detekován na třešních, višních, myrobalánech, švestkách a trnkách, je předpokládáno jeho celoplošné rozšíření (Blatný, 1958; Paulechová a Baumgartnerová, 1970; Navrátil a Šafařová, 2010; Polák a kol., 2007; Suchá a Svobodová, 2010).

3.2.3.2 *Prunus necrotic ring spot virus, PNRSV*

Virus nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ring spot virus, PNRSV*) infikující zástupce rodu *Prunus* je široce rozšířen v oblastech s mírným podnebím, kde jsou prunusy pěstovány (Adams a Antoniw: DPVWeb). Příznaky vyvolané infekcí PNRSV se objevují

na listech v podobě chloróz a nekróz, které mají tvar kroužků, skvrn či linek. Celkově se podobají symptomům způsobeným virem zakrslosti slivoně (PDV). U některých hostitelských rostlin může způsobovat opožděné pučení, odumírání celých listů a květů. Infekce může mít za následek celkové oslabení rostliny (Diekmann a Putter, 1996). PNRSV je přenosný vegetativně, pylem a semeny (Amari a kol., 2009; Aparicio a kol., 1999; Mink, 1993). V České republice byla infekce PNRSV zaznamenána na třešních, višních, myrobalánech, švestkách a trnkách (Blatný, 1958; Paulechová a Baumgartnerová, 1970; Navrátil a Šafařová, 2010; Polák, 2007; Suchá a Svobodová, 2010).

3.2.3.3 *Apple mosaic virus, ApMV*

Virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus, AMV*) infikuje zástupce rodu *Prunus*, zejména meruňky, třešně, švestky a broskvoně. Objevuje se zejména v Evropě (bývá nazýván také *European pattern line virus*), v Americe je jeho výskyt spíše vzácný. Příznaky infekce ApMV mají podobu nažloutlé mozaiky na listech (Diekmann a Putter, 1996). Přenos probíhá podle současných poznatků pouze vegetativně (Pallás a kol., 2012). V České republice byla infekce ApMV detekována na planě rostoucích švestkách a myrobalánech (Polák, 2007).

3.2.3.4 *American plum line pattern virus, APLPV*

American plum line pattern virus (APLPV) napadá zástupce rodu *Prunus*, jako japonské slívy, broskvoně a třešně (Pallás a kol., 2012). APLPV byl donedávna považován výhradně za americký virus, ale od roku 2002 se objevily zprávy o jeho výskytu i mimo Ameriku, a to v Itálii, Albánii, Tunisu (Myrta a kol., 2002), Palestině (Alayasa a kol., 2003) a Libanonu (Choueiri a kol., 2006). Symptomy infekce APLPV silně připomínají symptomy způsobené ApMV (mozaiky na listech nažloutlé, až krémové barvy), APLPV je proto považován za americkou obdobu ApMV, vyskytujícího se hlavně v Evropě (Diekmann a Putter, 1996). V České republice nebyla jeho přítomnost dosud potvrzena.

3.2.4 Čeleď *Betaflexiviridae*

Čeleď *Betaflexiviridae* je skupinou rostlinných virů. Zástupci rodů *Capillovirus* a *Trichovirus* jsou patogeny slivoní – jedná se o následující viry: *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*, *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus (APCLVS)*, *Peach mosaic virus (PMV)* a *Cherry virus A (CVA)* (Martelli a kol., 2007).

Virové částice zástupců této čeledi se vyznačují vláknitým tvarem o délce od 470 do 1000 nm a průměru 12-14 nm. Genom je představován jedinou jednovláknovou pozitivně orientovanou molekulou RNA o velikosti 6 až 9 kb (Martelli a kol., 2007).

Ačkoliv zástupci čeledi *Betaflexiviridae* nepůsobí takové škody na sklizni peckovin jako PPV, PNRSV či PDV, přesto nelze jejich ekonomický vliv zcela zanedbat. Důkazem můžou být rozsáhlé škody, které způsobuje *Peach mosaic virus* v broskvoňových sadech v Kalifornii či Mexiku (Uyemoto a Scott, 1992; Oldfield a kol., 1995).

3.2.4.1 *Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV*

Virus chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus* je členem rodu *Trichovirus*. Přirozeně infikuje řadu zástupců čeledi *Rosaceae*, kromě rodu *Prunus* také rody hrušeň (*Pyrus*) a jabloň (*Malus*) (Diekmann a Putter, 1996). Na švestkách může způsobovat onemocnění 'plum bark split' a 'pseudopox', které se projevuje podobnými příznaky jako šarka švestky (Dunez a kol., 1972). Výskyt ACLSV je rozsáhlý, byl detekován v řadě zemí (Al Rwahnih a kol., 2004; Ciešlínska a kol., 1995; German a kol., 1990; German-Retana a kol., 1997; Mandic a kol., 2007; Niu a kol., 2012; Pasquini a kol., 1998) pravděpodobně se vyskytuje ve všech oblastech, kde se pěstují jabloně (Adams a Antoniow: DPVWeb). Virus je přenosný mechanicky, vektorový přenos není prozatím znám (Adams a kol., 2004). V České republice byl ACLSV detekován na jabloních, švestkách a třešních (Karešová a Paprštejn, 2001), dále také na planě rostoucích švestkách a myrobalánech (Polák a kol., 2007).

3.2.4.2 *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus, APCLSV*

APCLSV je nedávno popsán a dosud málo známý virus rodu *Trichovirus* infikující řadu zástupců rodu *Prunus* (meruňky, švestky, japonskou slívu a broskvoně). Vyskytuje se v mnoha evropských státech (Candresse a kol., 2011), ale jeho výskyt není omezen pouze na Evropu - byl detekován také v Číně (Niu a kol., 2012). Příznaky způsobované pouze APCLSV je obtížné určit, neboť se velmi často vyskytuje ve směsné infekci s ACLSV (Liberti a kol., 2005; Niu a kol., 2012). K přenosu viru dochází mechanicky a vegetativně (Liberti a kol., 2005). V České republice byl nedávno detekován na švestce domácí (Šafařová a Navrátil, 2012).

3.2.4.3 *Peach mosaic virus, PcMV*

Virus mozaiky broskvoně (*Peach mosaic virus, PcMV*) je řazen do rodu *Trichovirus* a infikuje všechny ekonomicky významné zástupce rodu *Prunus* (Nemeth, 1986). PcMV způsobuje onemocnění 'peach mosaic', které se projevuje opožděným pučením, zakrslým vzrůstem, deformacemi a skvrnitostí listů (Martelli a kol., 2007). Toto onemocnění je široce rozšířeno v Severní Americe, zejména u broskvoní (Oldfield a kol., 1995; Pine, 1976),

zatímco mimo Severní Ameriku nebyl jeho výskyt zatím potvrzen (EPPO, 2013). Jako jediný ze zmiňovaných zástupců čeledi *Betaflexiviridae* je přenosný vektorem – roztočem *Eriophyes insidiosus*, Keifer & Wilson (Gispert a kol., 1998; Wilson a kol., 1955). Na území České republiky nebyl PcMV detekován.

3.2.4.4 *Cherry virus A, CVA*

Cherry virus A (CVA) náleží do rodu *Capillovirus*. Jeho hlavními hostitelskými rostlinami jsou třešně a višně, na nichž se vyskytuje po celém světě, často ve směsné infekci (zejména s PNRSV, PDV, ACLSV, CGRMV, CNRMV, LChV1, LChV2) (Isogai a kol., 2004; Kirby a kol., 2001; Komorowska a Cieślińska, 2004; Mandic a kol., 2007; Noorani a kol., 2010; Sabanadzovic a kol., 2005). Infekce ostatních zástupců rodu *Prunus* nejsou tak časté, ale objevují se (Barone a kol., 2006; Svanelle-Dumas a kol., 2005). CVA běžně nevyvolává na napadených rostlinách příznaky, ale v koinfekci s jiným virem může působit synergisticky a působit škody (Marais a kol., 2012). Virus je zřejmě přenosný pouze mechanicky a vegetativně, vektorový přenos nebyl zatím popsán (Adams a kol., 2004). V České republice se CVA vyskytuje, poprvé byl detekován na třešních (Grimová a kol., 2010) a později byla jeho přítomnost potvrzena také na švestkách (Šafářová a kol., 2013).

3.2.5 Čeleď *Secoviridae*

Čeleď *Secoviridae* je čeledí rostlinných virů, která byla oficiálně ustanovena teprve nedávno (King a kol., 2011). Sdružuje bývalé čeledi *Comoviridae* a *Sequiviridae* a dříve nezařazené rody *Cheravirus*, *Sadwavirus* a *Torradovirus*.

Virové částice zástupců této čeledi jsou neobalené, mají sférický tvar a průměr přibližně 25 – 30 nm. Genom je představován 1 nebo 2 jednovláknovými pozitivně orientovanými molekulami RNA – jednosložkový genom mají pouze viry podčeledi *Sequivirinae*, dvousložkový genom je charakteristický pro zástupce podčeledi *Comovirinae* a rodů *Cheravirus*, *Sadwavirus* a *Torradovirus* (Sanfaçon a kol., 2009). Celková velikost genomu se pohybuje od 9 do 12 kb (Adams a Antoniw: DPVWeb).

Slivoně nejsou příliš běžnými hostiteli této skupiny virů – častěji napadají ostatní zástupce rodu *Prunus*, jejich význam je ale natolik velký, že jsou zahrnuty do kontroly výsadbového materiálu (EPPO, 1990).

3.2.5.1 *Arabid mosaic virus, ArMV*

Arabid mosaic virus je členem rodu *Nepovirus*, mezi jehož hlavní hostitele patří réva vinná (*Vitis vinifera*, L.), jahodník (*Fragaria* spp., L.), ostružiník (*Rubus* spp., L.), reveň (*Rheum* spp., L.) a bez černý (*Sambucus nigra*, L.) (EPPO, 2013). Jeho výskyt byl potvrzen v Evropě, Americe i Asii (Iwaki a Komuro, 1974; Lister, 1960; Lockhart a kol., 2006; Rakhshandehroo a kol., 2006; Yardimci a Çulal, 2009). Nejběžnější příznaky ArMV jsou patrné na listech (chlorotické skvrny, deformace). Na vinné révě může tento virus působit tzv. 'fanleaf disease' a způsobovat tak rozsáhlé škody. ArMV je přenosný semenem a půdou, přičemž vektorem je hlístice druhu *Xiphinema diversicaudatum* (Mycoletzky) (Brown a kol., 1995; Mink, 1993). V České republice nebyl zatím tento virus na modrých prunosech objeven.

3.2.5.2 *Cherry rasp leaf virus, CLRV*

Cherry rasp leaf virus (CRLV) patří do rodu *Cheravirus*, který dříve nebyl taxonomicky zařazován do žádné čeledi (Fauquet a kol., 2005). Jeho hostitelský okruh je poměrně rozsáhlý a náleží do něj, mimo jiné, také prunusy. Je znám přirozený výskyt CLRV na třešních a broskvoních (Hansen a kol., 1974). Co se týče geografického rozšíření, CLRV byl zaznamenán v Severní Americe a na Novém Zélandu, v Evropě potvrzen zatím nebyl (Hansen a kol., 1974; Jones a Wood, 1978). Mezi příznaky pozorované na třešních patří zejména výrůstky na spodní straně listů (tzv. enace), ale infekce se může projevovat také celkovým oslabením stromu až jeho úhynem (Uyemoto a Scott, 1992). Přenos viru půdou je stejně jako u ostatních virů z rodu *Nepovirus* zajištěn hlísticemi, konkrétně druhem *Xiphinema americanum* (Cobb.) a *X. rivesi* (Dalmasso) (Brown a kol., 1995), dále je virus přenosný také semenem (Mink, 1993). Na našem území nebyl CLRV na slivoních detekován.

3.2.5.3 *Raspberry ringspot virus, RRSV*

Raspberry ringspot virus (RRSV), člen rodu *Nepovirus*, infikuje zejména ostružiník, ale také třešně, jahodník, révu vinnou a další hostitelské rostliny různých čeledí. Vyskytuje se převážně v evropských zemích, ale byl detekován také v Turecku a Kazachstánu (EPPO, 2013). RRSV je destruktivní zejména u révy vinné v Německu a Švýcarsku, kde je spolu s viry *Grapevine fanleaf virus* a *Arabid mosaic virus* původcem tzv. 'grapevine fanleaf disease'. Na třešních infikovaných RRSV se objevují symptomy jako listy menší velikosti s výraznými hrbolky na spodní straně listů (enacemi), infekce může ale mít vážnější projevy a vést až k odumření celého stromu (Wetzel a Krczal, 2007). RRSV je přenosný semenem a půdou, přičemž vektorem jsou hlístice druhů *Longidorus elongatus* (de Man), *L. macrosoma* (Hooper) a *Paralongidorus maximus* (Bütschli) (Mink, 1993).

3.2.5.4 *Tomato ringspot virus, ToRSV*

Tomato ringspot virus (ToRSV) náleží do rodu *Nepovirus* a vyznačuje se širokým okruhem hostitelů. Významný je zejména tím, že se vyskytuje a působí škody na jabloni (*Malus domestica*, Borkh.), vinné révě, ostružiníku maliníku (*Rubus idaeus*, L.) a také na různých druzích rodu *Prunus* (Uyemoto a Scott, 1992). Jeho rozšíření není zřejmě příliš velké, vyskytuje se zejména v Severní Americe, v oblastech mírného klimatu, kde je přítomný jeho vektor (ze skupiny hlístic) (Adams a Antoniow: DPVWeb). Mimo Ameriku byl zaznamenán jen sporadický výskyt, a to zejména na pelargonii (Christensen a Paludan, 1978; Rydén, 1972), ale i jiných hostitelích (Iwaki a Komuro, 1971; Fry a Wood, 1978). Na prunusech, včetně švestek a myrobalánů, způsobuje ToRSV onemocnění 'brownline disease' (Auger, 1989; Mircetich a Hoy, 1981), které se nejprve projevuje zpomaleným růstem koncových větví, postupně dochází k opadu listů, odumírání koncových výhonků a může dojít až k úhynu stromu (Hoy a kol., 1984). Jako všechny nepoviry také ToRSV je přenášen v půdě hlísticemi, konkrétně druhy *Xiphinema americanum* (Cobb.) a *X. rivesi* (Dalmasso) (Brown a kol., 1995). Přenos probíhá také semeny (Mink, 1993). Výskyt ToRSV v České republice nebyl dosud zaznamenán.

3.2.5.5 *Tomato black ring virus, TBRV*

Tomato black ring virus (TBRV) je řazen do rodu *Nepovirus* s rozsáhlým okruhem hostitelů zahrnujícím kromě prunusů také révu vinnou, ostružiník, jahodník, zástupce čeledi *Solanaceae* a další (Brunt a kol., 1996; Harrison, 1957; Pospieszny a kol., 2004). Virus je široce rozšířen v Evropě, méně pak v Asii a Americe (EPPO, 2013). Příznaky způsobované infekcí TBRV se objevují zejména na listech v podobě chlorózy, nekrózy, zesvětlení žilek a deformací (Brunt a kol., 1996). Přenos zajišťují hádčátka *Longidorus attenuatus* (Hooper), *L. elongatus* (de Man) (Brown a kol., 1995). Přítomnost TBRV na našem území nebyla na prunusech zaznamenána.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci bakalářské práce bylo testováno 28 stromů druhů *Prunus domestica*, *P. spinosa* a *P. cerasifera*. Vzorky listů byly odebrány na lokalitách: Přírodní rezervace Malý Kosíř, okr. Olomouc (9. 9. 2014), Národní park Podyjí a poblíž obce Šumice, Zlínský kraj (19. 9. 2014), seznam všech vzorků je uveden v Tabulce 3.

Jednotlivé vzorky byly krátkodobě uchovávány v chladničce při 4 °C, pro dlouhodobější uchovávání bylo asi 80 mg listů umístěno do 2 ml zkumavky a lyofilizováno při – 50 °C po dobu 24 hodin. Poté byly zkumavky s listy okamžitě uzavřeny a lyofilizované vzorky pak byly uchovávány při – 70 °C.

Vzorky byly testovány na přítomnost následujících virů: *Plum pox virus* (PPV), patřící do čeledi *Potyviridae*, *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV) – oba náležící do čeledi *Bromoviridae* a viry z rodů *Trichovirus*, *Capillovirus* a *Foveavirus* patřících do čeledi *Betaflexiviridae*.

4.2 Metody

4.2.1 Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA byla použita metoda izolace nukleových kyselin na silikagelu, tzv. Silica capture, modifikovaný postup podle Ciešlínska (2004). Před vlastní izolací bylo nutné připravit potřebné pracovní roztoky, jejichž složení je uvedeno v podkapitole Složení použitých roztoků.

Do zkumavky s lyofilizovaným materiálem bylo přidáno 1,4 ml PBS – TPO pufru a vzorek byl homogenizován pomocí homogenizátoru FastPrep (MP Biomedicals) po dobu 5 min, při 5 M/S. Zhomogenizovaný rostlinný materiál byl centrifugován 2 min při 12 000 rpm. V mezičase bylo v mikrozkuhavce smícháno 40 µl SC pufru a 900 µl pufru L6, zkumavka byla zvortexována do mléčného zakalení a ponechána stát přibližně 10 minut při pokojové teplotě. K takto připravené suspenzi bylo přidáno 50 µl supernatantu homogenizovaného listu.

Tabulka 3: Seznam vzorků

Číslo vzorku	Číslo izolace	Lokalita	Druh stromu	Datum sběru
1	93	Malý Kosíř	<i>Prunus spp.</i>	9.9.2014
2	96	Malý Kosíř	<i>P. domestica</i>	9.9.2014
3	97	Malý Kosíř	<i>P. cerasifera</i>	9.9.2014
4	98	Malý Kosíř	<i>P. domestica</i>	9.9.2014
5	99	Malý Kosíř	<i>P. cerasifera</i>	9.9.2014
6	101	Malý Kosíř	<i>P. spinosa</i>	9.9.2014
7	103	Malý Kosíř	<i>P. cerasifera</i>	9.9.2014
8	104	Malý Kosíř	<i>P. spinosa</i>	9.9.2014
9	105	Malý Kosíř	<i>P. spinosa</i>	9.9.2014
10	107	Malý Kosíř	<i>P. domestica</i>	9.9.2014
11	113	Malý Kosíř	<i>P. cerasifera</i>	9.9.2014
12	114	Malý Kosíř	<i>P. cerasifera</i>	9.9.2014
13	150	Šumice	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
14	152	Šumice	<i>P. cerasifera</i>	19.9.2014
15	153	Šumice	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
16	154	Šumice	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
17	155	Šumice	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
18	156	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
19	158	NP Podyjí	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
20	159	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
21	160	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
22	161	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
23	162	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
24	164	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
25	165	NP Podyjí	<i>P. spinosa</i>	19.9.2014
26	174	NP Podyjí	<i>P. domestica</i>	19.9.2014
27	177	NP Podyjí	<i>P. cerasifera</i>	19.9.2014
28	178	NP Podyjí	<i>P. domestica</i>	19.9.2014

Přebytek supernatantu byl uschován pro pozdější použití a uchováván při teplotě – 80 °C. Vzorek se směsí L6 a SC pufu byl zvortexován a ponechán stát 10 min při pokojové teplotě. Poté byl opět vortexován, centrifugován 16 s při 12 000 rpm a pomocí vývěvy (Vakuová pumpa, MILLIPORE) byl odstraněn supernatant. Sediment byl promyt 900 µl pufu L2, vortexován, opětovně centrifugován po dobu 16 s při 12 000 rpm. Supernatant byl znovu odstraněn vývěvou a celý tento krok promývání pufrem L2 byl zopakován (přidání 900 µl L2, vortexování, centrifugace 16 s při 12 000 rpm a odstranění supernatantu vývěvou). Následně bylo k sedimentu za účelem promytí přidáno 900 µl 70% ethanolu vychlazeného na 4 °C,

zkumavka byla zvortexována a centrifugována po dobu 16 s při 12 000 rpm, supernatant odstraněn pomocí vývěvy a krok promývání ethanolem byl opakován. Poté bylo k sedimentu přidáno 900 µl acetonu, vzorek byl zvortexován a centrifugován po dobu 16 s při 12 000 rpm. Supernatant byl opět odstraněn vývěvou. Pelet byl následně v otevřené zkumavce vysušen v termobloku po dobu asi 5 min při 56 °C. Nakonec byla RNA uvolněna do vodné fáze: k sedimentu bylo přidáno 50 µl sterukbá deionizované vody, vzorek byl krátce zvortexován a inkubován 10 min v uzavřené zkumavce při 56 °C v termobloku. Poté byla zkumavka krátce zvortexována a stočena 16 s při 12 000 rpm. Vodná fáze obsahující RNA byla odpipetována a převedena do nové mikrozkuavky. Koncentrace a kvalita izolované RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), a RNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě – 70 °C.

4.2.2 Detekce viru šarky švestky (PPV)

Pro detekci viru šarky švestky byla použita RT-PCR podle Wetzel a kol. (1992), typizace zjištěných izolátů byla následně provedena podle Šubr a kol. (2004).

V prvním kroku byla provedena reverzní transkripce za použití specifického PPV1 (detekce) nebo random primerů (typizace) pro přepsání RNA viru do cDNA.

Nejprve byly s ohledem na počet analyzovaných vzorků namíchány 2 reakční směsi (tzv. premixy). Celý postup byl prováděn za sterilních podmínek v laminárním boxu. Zkumavky byly drženy na ledu, aby nedošlo k nežádoucím změnám v chemikáliích a vzorcích. Premix I byl připraven napipetováním reakčních položek do 1,5ml mikrozkuavky, složení viz Tabulka 4.

Směs byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a po 10 µl rozpipetována do 0,5 ml zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno po 3 µl RNA vzorku. Zkumavky byly zcentrifugovány a inkubovány 5 min při 70 °C v termobloku, poté byly zkumavky ihned přemístěny do ledu. Ke vzorkům bylo poté přidáno 27 µl druhé reakční směsi, složení viz Tabulka 4. Zkumavky pak byly umístěny do termobloku, reverzní transkripce probíhala po dobu 60 min, při teplotě 42°C při použití specifického primeru anebo 37 °C při použití random primerů.

PPV byl následně detekován v získané cDNA pomocí PCR s použitím primerů PPV1 a PPV2. Byla připravena reakční směs s ohledem na počet analyzovaných vzorků, složení viz Tabulka 5, která byla rozpipetována po 22 µl do 0,2ml PCR zkumavek. K reakční směsi byly

přidány 3 μ l cDNA. Zkumavky byly jemně protřepány, stočeny na minicentrifuze a vloženy do termocykleru. PCR reakce byla provedena za modifikovaných podmínek podle Wetzel a kol. (1992), viz Tabulka 7.

Typizace viru šarky švestky byla dokončena pomocí specifických PCR využívající jako templát cDNA vytvořenou pomocí reverzní transkripce s random primery. Byly použity tři kombinace primerů mD5/mD3 pro identifikaci kmenu D, mM5/mM3 pro kmen M a mD5/mM3 pro kmen Rec. Byly připraveny tři reakční směsi, jež se lišily pouze použitou kombinací primerů, složení viz Tabulka 6. Směsi byly krátce zvortexovány, stočeny na minicentrifuze a rozpipetovány po 22 μ l do 0,2ml PCR zkumavek, do kterých bylo přidáno po 3 μ l reverzního transkriptu. Zkumavky byly jemně protřepány, stočeny na minicentrifuze a vloženy do termocykleru, PCR reakce probíhala za podmínek podle Šubr a kol. (2004), viz Tabulka 8.

Tabulka 4: Složení RT reakčních směsí pro jeden vzorek (detekce PPV)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
Premix I			
H ₂ O			9
Primer 1*	20 pmol/ μ l	0,5 μ M	1
Premix II			
H ₂ O			15,5
RT-PCR buffer	5x	1x	8
dNTP	10 mM	500 μ M	2
Ribnuklase inh.	40 U/ μ l	20 U/reakce	0,5
AMV RT Pol	10 U/ μ l	10 U/reakce	1

*Primer 1 – PPV1 (detekce PPV) / Random primer (typizace PPV)

Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek (detekce PPV)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
Pufr	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5
H ₂ O			14,68
dNTP	2mM	200 μM	2,5
f primer*	20 pmol/μl	0,25 μM	0,31
r primer**	20 pmol/μl	0,25 μM	0,31
Taq pol	5 U/μl	1 U/reakce	0,2

*f primer – PPV1

**r primer – PPV2

Tabulka 6: Složení PCR reakční směsi pro jeden vzorek (typizace PPV)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
Pufr (MyTaq pol.)	10x	1x	5
H ₂ O			16,25
dNTP	2mM	200 μM	2,5
f primer*	20 pmol/μl	0,25 μM	0,25
r primer**	20 pmol/μl	0,25 μM	0,25
MyTaq Polymerase	5 U/μl	1,25 U/reakce	0,25

*f primer – kmen PPV-D: mD5; kmen PPV-M: mM5; kmen PPV-Rec: mD5

*r primer – kmen PPV-D: mD3; kmen PPV-M: mM3; kmen PPV- Rec: mM3

Tabulka 7: Podmínky PCR (detekce PPV)

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
94	3 min	1
94	30 s	40
62	30 s	
72	30 s	
72	10 min	

Tabulka 8: Podmínky PCR (typizace PPV)

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
94	3 min	1
94	45 s	35
60	30 s	
72	60 s	
72	7 min	1

4.2.3 Detekce PDV

Pro detekci *Prune dwarf virus*, PDV byla použita RT-PCR provedená dvěma postupy, a to podle Lenz a kol. (2008) s použitím primerů PDV 2 a PDV 2R, a podle Mekuria a kol. (2003) s použitím primerů PDV1F a PDV1R.

V obou případech byla nejprve namíchána reakční směs s ohledem na počet analyzovaných vzorků. Postup byl prováděn za sterilních podmínek, chemikálie a vzorky byly drženy na ledu. Premix byl připraven napipetováním reakčních komponent do 1,5ml mikrozkušavky, složení viz Tabulky 9 a 10. Směs ve zkumavce byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a rozpipetována po 22 μ l (Lenz a kol., 2008) nebo po 17 μ l (Mekuria a kol., 2003). Do každé zkumavky byly přidány 3 μ l RNA vzorku. Zkumavky byly zcentrifugovány a umístěny do termocykleru. PCR reakce probíhala za podmínek podle Lenz a kol., 2008 a podle Mekuria a kol., 2003 – viz Tabulka 11, podmínky se lišily pouze teplotou nasedání primerů.

4.2.4 Detekce PNRSV

Pro detekci *Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV byla použita RT-PCR provedená dvěma postupy. První postup podle Lenz a kol. (2008) s použitím primerů PNRSV 2 a PNRSV 2R, druhý podle Marbot a kol. (2003) s použitím primerů PNRSV 10F a PNRSV 10 R.

V obou případech byla nejprve namíchána reakční směs s ohledem na počet analyzovaných vzorků. Postup byl prováděn za sterilních podmínek, chemikálie a vzorky byly drženy na ledu. Premix byl připraven napipetováním reakčních komponent do 1,5ml mikrozkušavky, složení viz Tabulky 9 a 10. Směs ve zkumavce byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a rozpipetována po 22 μ l (Lenz a kol., 2008) nebo po 17 μ l (Marbot a kol., 2003). Do každé zkumavky byly přidány 3 μ l RNA vzorku. Zkumavky byly zcentrifugovány a umístěny do termocykleru. PCR reakce probíhala za podmínek podle Lenz a kol., 2008 nebo za modifikovaných podmínek podle Marbot a kol., 2003 – viz Tabulka 11, podmínky reakce se lišily pouze teplotou nasedání primerů.

Tabulka 9: Složení RT-PCR reakční směsi pro jeden vzorek (detekce PDV a PNRSV – Lenz a kol., 2008)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
RT-PCR buffer	5x	1x	5
H ₂ O			13,6
dNTP	10 mM	200 μM	0,5
Primer 1*	20 pmol/μl	1 mM	1,25
Primer 2**	20 pmol/μl	1 mM	1,25
AMV RT Pol	10 U/μl	2 U/reakce	0,2
Ribnuklase inh.	40 U/μl	20 U/reakce	0,2
Taq Pol	5 U/μl	1 U/reakce	0,2

* Primer 1 – PDV 2 nebo PNRSV 2

**Primer 2 – PDV 2R nebo PNRSV 2R

Tabulka 10: Složení RT-PCR reakční směsi pro jeden vzorek (detekce PDV a PNRSV – Mekuria a kol., 2003 a Marbot a kol., 2003)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
RT-PCR buffer	5x	1x	5
H ₂ O			9,3
dNTP	10 mM	200 μM	0,4
Primer 1*	20 pmol/μl	0,4 μM	0,4
Primer 2**	20 pmol/μl	0,4 μM	0,4
Rnase inhibitor	40 U/reakce	10 U/reakce	0,25
AMV RT Pol	10 U/μl	10 U/reakce	1
Taq Pol	5 U/μl	1,25 U/reakce	0,25

*Primer 1 – PDV1F nebo PNRSV 10F

**Primer 2 – PDV1R nebo PNRSV 10R

Tabulka 11: Podmínky RT-PCR (detekce PDV a PNRSV – Lenz a kol., 2008 a Mekuria a kol., 2003)

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
42	45 min	1
95	5 min	1
95	30 s	35
60/56/55*	30 s	
72	1 min	
72	7 min	1

*Podmínky RT-PCR se lišily pouze teplotou nasedání primerů (Lenz a kol., 2008 – 60 °C, Mekuria a kol., 2003 – PDV 56 °C, PNRSV 55 °C).

4.2.5 Detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*

Pro detekci virů z čeledi *Betaflexiviridae* byla použita PDO nested-RT-PCR podle Foissac a kol. (2005). Nejprve byla připravena reakční směs pro RT-PCR napipetováním reakčních složek do 1,5ml zkumavky, složení viz Tabulka 12. Směs byla krátce zvortexována, stočena na minicentrifuze a po 22 μ l rozpipetována do 0,2ml zkumavek. Do každé zkumavky byly přidány 3 μ l RNA vzorku. Zkumavky byly zcentrifugovány a umístěny do termocyklieru. RT-PCR probíhala za podmínek podle Foissac a kol. (2005), viz Tabulka 14.

V druhém kroku byly viry z čeledi *Betaflexiviridae* detekovány v cDNA získané z předchozí RT-PCR pomocí nested PCR s použitím dvou kombinací primerů: PDO-F2i/PDO-R1i (zaměřené na detekci virů ACLSV, ASPV, CVA, CGRMV a ASGV) anebo NT1/NT3 (zaměřené na detekci APCLSV). Byly připraveny dvě reakční směsi lišící se použitými primery. Reakční komponenty byly napipetovány do 1,5ml zkumavky, složení viz Tabulka 13. Směs byla krátce protřepána, stočena na minicentrifuze, rozpipetována po 22 μ l a do každé byly přidány 3 μ l cDNA z předchozí RT-PCR. Zkumavky byly zcentrifugovány a vloženy do termocyklieru. PCR reakce byla provedena za podmínek podle Foissac a kol. (2005), viz Tabulka 15. Podmínky reakce se lišily jen teplotou nasedání primerů, a to 42°C pro PDO-F2i/PDO-R1i, 58°C pro NT1/NT3.

Tabulka 12: Složení RT-PCR reakční směsi pro jeden vzorek (detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μl]
RT-PCR buffer	5x	1x	5
H ₂ O			12,35
dNTP	10 mM	200 μ M	0,5
Primer PDO-F1i	20 pmol/ μ l	1 mM	1,25
Primer PDO-R3i	20 pmol/ μ l	1 mM	1,25
Primer PDO-R4i	20 pmol/ μ l	1 mM	1,25
AMV RT Pol	10 U/ μ l	2 U/reakce	0,2
MyTaq Pol	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,2

Tabulka 13: Složení nested PCR reakční směsi pro jeden vzorek (detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*)

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetováno na 1 test [μ l]
H ₂ O			10,7
Pufř	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,8 mM	2,8
dNTP	2 mM	200 μ M	2,5
f primer*	20 pmol/ μ l	1 μ M	1,25
r primer**	20 pmol/ μ l	1 μ M	1,25
Taq pol	1 U/ μ l	1 U/reakce	1

*f primer – PDO-F2i nebo NT1

**r primer – PDO-R1i nebo NT3

Tabulka 14: Podmínky RT-PCR (detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*)

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
42	45 min	1
95	3 min	1
95	30 s	35
42	30 s	
72	30 s	
72	7 min	1

Tabulka 15: Podmínky nested PCR (detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*)

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
95	3	1
95	0,5	30
X*	0,5	
72	0,5	

*42 $^{\circ}$ C pro PDO-F2i/PDO-R1i, 58 $^{\circ}$ C pro NT1/NT3.

Tabulka 16: Seznam použitých primerů

Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
PPV1	CCCTCACATCACCAGAGCCA	243	Wetzel a kol., 1992
PPV2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA		
PDO-F1i	TiTTYATKAARWSiCARYWiTGiAC*	446/631	Foissac a kol., 2005
PDO-R3i	GCRCACATRTCRTCiCCiGCRAAiiA*		
PDO-R4i	ARiYiCCATCCRCARAAMiTiGG*		
PDO-F2i	GCYAARGCiGGiCARACiYTKGciTG*	362	
PDO-R1i	TCHCCWGTRAAiCKSATiAiiGC*	218	
NT1	ARATACTYTCMARYTGTCTRC*		
NT3	ATKATTTTTYTCATCCCABCCY*	812	
PDV 2	CGATTGGTAACTCACTTTG		
PDV 2R	AGCAGCATTTCCAACACTACGA		
PNRSV 2	CGATTGGTAACTCACTTTG	833	Lenz a kol., 2008
PNRSV 2R	GGGGCATCCACAACCTTCAC		
PDV-1-F	GTATGATATCTCGTACCGAG	241	Mekuria a kol., 2003
PDV-1-R	CTGGCTTGTTCGCTGTGAA		
PNRSV 10-F	TTCTTGAAGGACCAACCGAGAGG	348	Marbot a kol., 2003
PNRSV 10-R	GCTAACGCAGGTAAGATTTCCAAGC		
mD5	TATGTCACATAAAGGCGTTCTC	664 (s mD3) / 605 (s mM3)	Šubr a kol., 2004
mD3	GACGTCCCTGTCTCTGTTG	664 (s mD5)	
mM5	GCTACAAAGAACTGCTGAGAG	459 (s mM3)	
mM3	CATTTCCATAAACTCCAAAAGAC	459 (s mM5) / 605 (s mD5)	

* i = inosin; Y = C, T; K = G, T; R = A, G; W = A, T; S = G, C; M = C, A; H = A, T, C

4.2.6 Elektroforetická separace

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí elektroforetické separace na 1,5% agarózovém gelu.

Zásobní roztok 1,5% agarózového gelu byl připraven smícháním 3,5 g agarózy (Agarose I, AMBRESKO) a 300 ml 1x TAE pufru a jejím rozvařením v mikrovlnné troubě. Rozvařený gel byl okamžitě použit anebo byl ponechán vychladnout a dlouhodobě uchováván v lednici při 4 °C. Ze zásobního rozvařeného roztoku bylo odlito 50 ml agarózy do kádinky. Po mírném vychladnutí byly přidány 3 µl fluorescenčního barviva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, *E. coli*) anebo 3 ul GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Stain, Biotium) a roztok byl

pečlivě promíchán. Tekutý gel byl poté nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínky a ponechán 30 až 45 min při pokojové teplotě ztuhnout. Po ztuhnutí byl gel přelit 1x TAE pufrům po rysku vyznačenou na elektroforetické komoře a hřebínky byly z gelu vyjmuty.

Do první jamky byly napipetovány 2 μ l standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp DNA (Fermentas), do dalších jamek bylo pipetováno 5-7 μ l jednotlivých PCR produktů smíchaných se 2 μ l 0,1 % bromfenolové modři.

Elektroforéza byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu při napětí 70 – 80 V a DNA byla separována 30 – 45 min. Poté byl gel vyjmut z elektroforetické vany a výsledek elektroforetické separace byl vizualizován a následně dokumentován na UV transluminátoru pomocí dokumentačního zařízení Syngene (Transluminátor G:BOX, Syngene, firma Herolab).

4.2.7 Sekvenování

Byly sekvenovány 4 vzorky pozitivní na přítomnost virů čeledi *Betaflexiviridae* (použité primery PDO-F2i, PDO-R1i) – vzorky č. 15, 16, 17, 19 viz Tabulka 3: Seznam vzorků.

4.2.7.1 Izolace PCR produktu z gelu

Izolace PCR produktu z gelu byla provedena pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN, podle postupu popsáno v QIAquick Spin Handbook 07/2002, QIAGEN.

Byl připraven 1% agarózový gel, 75 ml gelu bylo smícháno s 5 μ l 1% ethidium bromidu a nalito do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel přelit 1x TAE pufrům po rysku vyznačenou na elektroforetické komoře a hřebínky byly z gelu vyjmuty.

Do první jamky byly napipetovány 2 μ l standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp DNA (Fermentas), do dalších jamek byl nanesen veškerý PCR produkt smíchaný s 5 μ l 0,1% bromfenolové modři. Elektroforetická separace byla provedena při 80 V, po dobu 30-45 min.

Gel byl poté umístěn na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu a sterilním skalpelem z něho byl vyříznut PCR produkt. Vyříznutý gel byl umístěn do označené 1,5 ml mikrozkušavky typu eppendorf. Na každý vzorek byl použit nový skalpel, aby se zabránilo kontaminaci. Byla zjištěna váha gelu ve zkumavce a přidán QG pufr v poměru 3 - 1 (300 μ l QG pufru na 100 μ g gelu). Zkušavky byly inkubovány 10 min při 50 °C v termobloku, do úplného rozpuštění gelu. Byl přidán 1 objem izopropanolu (při navážce 100 μ g – 100 μ l

izopropanolu). Byla přichystána kolonka pro izolaci DNA (fialová kolonka byla vložena do sběrné zkumavky). Směs byla napipetována na kolonku a kolonka byla centrifugována po dobu 1 min při 13 000 rpm. Ze sběrné kolonky bylo vylito, co protéklo a do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru QG. Kolonka ve sběrné zkumavce byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm. Nakonec byla kolonka umístěna do nové 1,5 ml zkumavky a bylo do ní napipetováno 30 µl destilované vody. Zkumavka s kolonkou byla opět centrifugována 1 min při 13 000 rpm.

Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí fluorimetru (Fluorimetr DyNA Quant 200, Hoefer).

Izolovaná DNA byla dlouhodobě uchovávána při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.7.2 Sekvenační značení

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí komerčního kitu (Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems), podle pokynů výrobce. Pro všechny vzorky byla připravena reakční směs, složení viz Tabulka 17. Templátová DNA byla naředěna podle koncentrace změřené fluorimetrem tak, aby bylo v 6 µl přítomno 20 – 25 ng DNA. Jako sekvenční primery byly použity PDO-F2i, PDO-R1i. PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v Tabulce 18. Sekvenační analýza byla provedena genetickým analyzátozem ABI PRISM 3730 na ÚEB AV ČR, Olomouc.

Tabulka 17: Složení reakční směsi pro sekvenační značení

Položka	Pipetováno na 1 test [µl]
Pufr 10x	1
BigDye	1
Primer (1,6 pmol/µl)	2
DNA	6

Tabulka 18: Podmínky PCR pro sekvenační značení

Teplota	Čas	Počet cyklů
96	1 min	1
96	10 s	35
50	5 s	
60	4 min	

4.2.7.3 Analýza sekvencí

Výstupy ze sekvenátoru byly sestaveny do výsledných kontigů pomocí programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.) a poté identifikovány prostřednictvím programu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Sekvence izolátů byly porovnány mnohočetným alingmentem se sekvencemi ACLSV dostupnými v databázi GenBank v programu ClustalW v MEGA 6 (Tamura a kol., 2013). Takto byla sestavena matice, na jejímž základě byla provedena fylogenetická analýza neighbor-joining metodou v programu MEGA 6. Výsledný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí programu Tree Explorer (MEGA 6).

4.3 Použité chemikálie a roztoky, přístrojové vybavení

Veškeré chemikálie, roztoky a přístroje, které byly používány, při provádění experimentů pro tuto bakalářskou práci jsou uvedeny abecedně seřazené v následujících podkapitolách.

4.3.1 Použité chemikálie a roztoky

0,1% bromfenolová modř v 30% glycerinu

0,1M Tris/Cl, pH 6,4 (2,42 g Tris, 160 ml vody, doplněno na 200 ml, pH upraveno na 6,4 pomocí HCl)

70% ethanol

96% ethanol

Agarose I, AMBRESKO

AMV Reverse Transcriptase, Promega

Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems

dNTP Mix, Fermentas

GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas

GoodView™ Nucleic Acid Stain, SBS Genetech

Isopropanol

L2 pufr (60 g GuSCN rozpuštěno v 50 ml 0,1M Tris, pH 6,4 ve vodní lázni, 62 – 64 °C)

L6 pufr (30 g GuSCN rozpuštěno v 25 ml 0,1M Tris, pH 6,4 ve vodní lázni, 62 – 64 °C, přidáno 5,5 ml 0,2M EDTA, pH 8,0 a 0,65 g Tritonu X-100)

Oxid křemičitý – SC (60 g oxidu křemičitého rozpuštěno v 0,5 l vody, necháno stát přes noc, po 24 hodinách odstraněno 430 ml tekuté části nad sedimentem, doplněno na 500 ml, protřepáno, necháno 5 hodin sedimentovat, poté odstraněno 440 ml tekuté části, zbytek promíchán a přidáno pár kapek 32% HCl pro ustálení pH na hodnotě 2, suspenze byla sterilizována autoklávováním)

PBS – T (0,5 ml 10% roztoku Tween – 20 přidáno ke 100 ml PBS)

PBS – TPO (2 g PVP – 40 a 0,2 g ovalbuminu rozetřeno s malým množstvím PBS – T a doplněno roztokem PBS – T na 100 ml)

PBS pufr (v 800 ml vody rozpuštěno 8 g NaCl, 7,2 g Na₂HPO₄*2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ a 0,2 g KCl, zkontrolováno pH zda odpovídá hodnotě 7,4 a doplněno vodou na 1 l)

QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen

rRNasin® RNase inhibitor, Promega

sterilní deionizovaná voda

TAE pufr 50x (242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 37,2 g Na₂EDTA*2H₂O, doplněno vodou na 1 l a pH upraveno na 8,5)

Taq DNA Polymerase, Biolabs

TBE pufr 10x (108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5M EDTA, doplněno vodou na 1 l a pH upraveno na 8)

4.3.2 Přístrojové vybavení

Centrifuga Multi-Spin MSC-3000, BIOSAN

Centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet

Fluorimetr DyNA Quant 200, Hoefer

Homogenizátor FastPrep-24, MP Biomedicals

Icematic F100, Compact Ice flackers, Gemini BV

Laminární box PV-100, Telstar

Lyofylizátor PowerDry PL 3000, Thermo electron corporation

Míchačka laboratorní, RCT basic, IKA ®

Mikrovlnná trouba

Minicentrifuga Prism Mini, Labnet

NanoDrop 1000 Thermo Scientific Spectrophotometer

pH metr – pH Microprocessor pH Meter, HANNA instruments

Souprava pro elektroforézu

Termoblok DRI-BLOCK® DB-20, Techne

Termocykler T100 Thermal Cycler, BIO-RAD

Termocykler T-personal, Biometra

UV Transluminátor G:BOX, dokumentační systém Syngene

Váhy analytické METTLER AE 240

Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.

Vakuová pumpa Vacuum Pump XF54 230 50, MILLIPORE

Vortex MS1 Minishaker, IKA ®

Vortex MS2 Minishaker, IKA ®

Zdroj elektrického napětí MP-250V, BioTech

5 VÝSLEDKY

V rámci experimentální části bakalářské práce bylo testováno 28 vzorků ze stromů švestky domácí (*Prunus domestica*), trnky obecné (*P. spinosa*) a myrobalánu (*P. cerasifera*). Jednalo se o plané či zplanělé stromy rostoucí ve starých sadech a podél okrajů cest, z nichž některé byly bezpříznakové, jiné naopak vykazovaly zřetelné symptomy virové infekce. Testované myrobalány a trnky pocházely z lokalit, které se nenacházely v blízkosti zamořených sadů.

V jednotlivých vzorcích byla provedena detekce následujících virů: virus šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV), virus nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV), virus zakrslosti slivoně (*Prune dwarf virus*, PDV) a viry z rodů *Trichovirus*, *Capillovirus* a *Foveavirus* patřících do čeledi *Betaflexiviridae*.

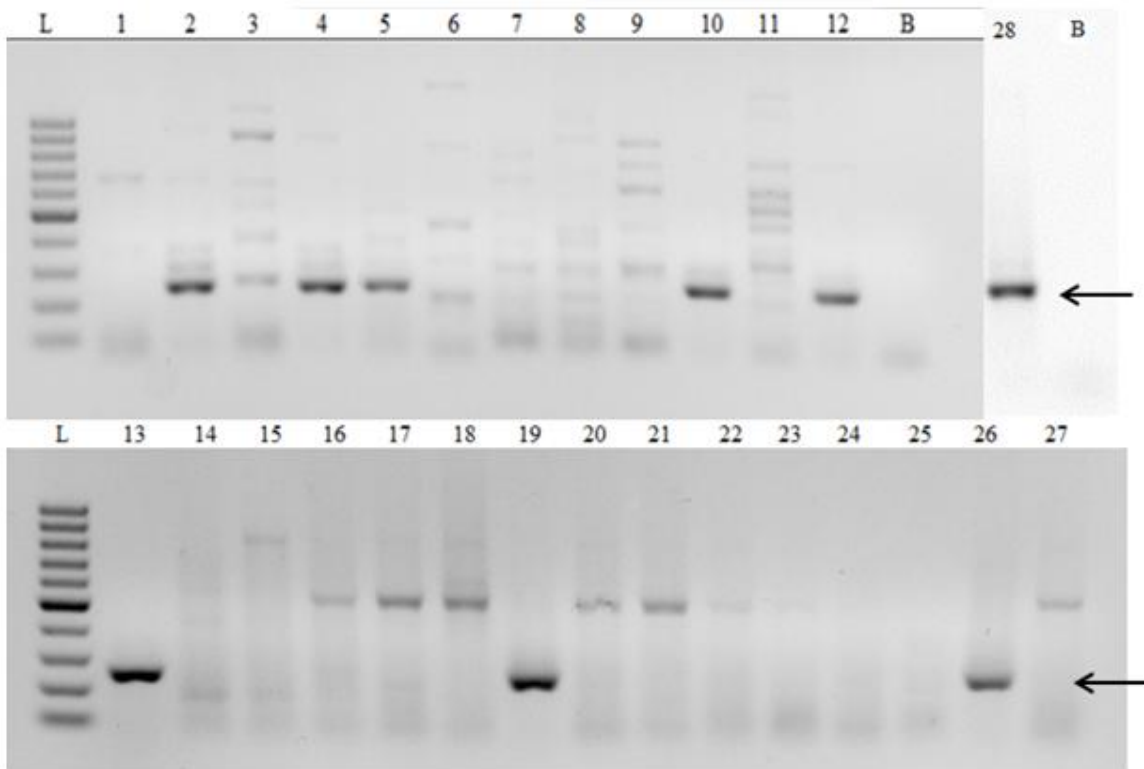
5.1 Detekce PPV

K detekci PPV byla použita standardní metoda RT-PCR podle Wetzel a kol. (1992). V souboru vzorků, z nichž některé vykazovaly typické příznaky infekce PPV (viz Obrázek 3, Obrázek 4), byl virus šarky švestky detekován v devíti z celkového počtu 28 vzorků. A to, ve třech švestkách (číslo vzorku 2, 4 a 10) a u dvou myrobalánů (číslo vzorku 5 a 12) původem z Malého Kosíře, ve třech švestkách (číslo vzorku 19, 26 a 27) z NP Podyjí, a v jedné švestce (číslo vzorku 13) ze Šumic (viz Obrázek 4).

Obrázek 3: Příznaky na listech švestky domácí



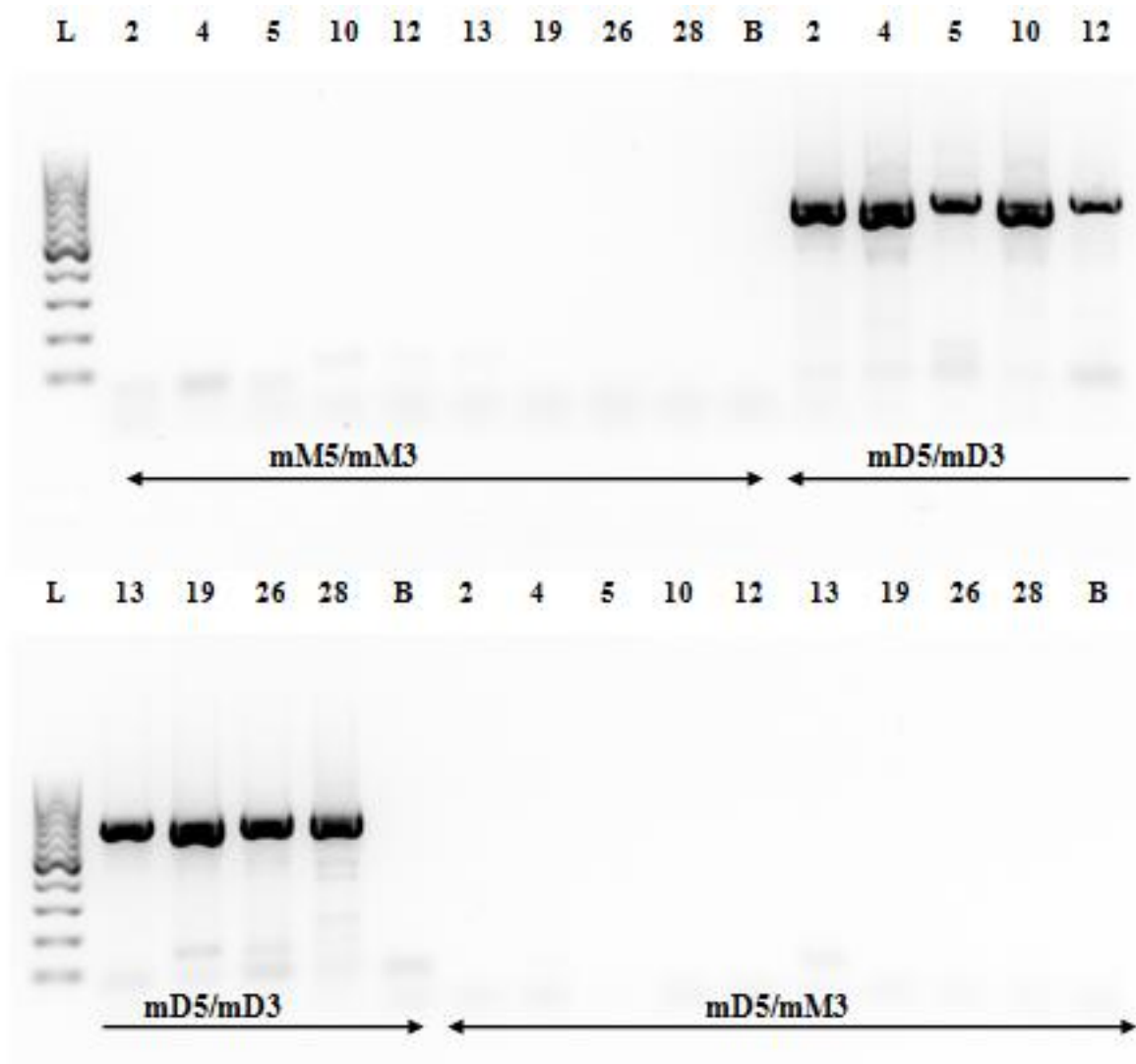
Obrázek 4: Detekce viru šarky švestky



(L: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas; 1 – 28: jednotlivé vzorky č. 1 – 28; B: blank; šipka označuje specifický produkt)

Pomocí specifické RT-PCR s použitím primerů mD5, mMD3, mM5 anebo mM3 byl u všech pozitivních vzorků získán produkt, očekávané velikosti 243 bp, pouze v PCR s pomocí primerů mD5 a mD3. Detekované izoláty PPV proto přísluší ke kmeni PPV-D (viz Obrázek 5).

Obrázek 5: Typizace izolátů PPV pomocí specifické RT-PCR podle Šubr a kol. (2004)



(L: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas; čísla označují jednotlivé pozitivní vzorky; B: blank)

5.2 Detekce PDV

K detekci PDV byly použity dva postupy RT-PCR, první podle podle Lenz a kol. (2008) a druhý podle Mekuria a kol. (2003). Ani v jednom případě nebyl získán produkt (viz Obrázek 6).

Obrázek 6: Příklad detekce PDV



(L: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas; 1 – 14: jednotlivé vzorky č. 1 – 14; B: blank)

5.3 Detekce PNRSV

Stejně jako u detekce PDV, byly také u detekce PNRSV použity dva postupy RT-PCR – podle Lenz a kol. (2008) a Mekuria a kol. (2003). Specifický produkt nebyl získán ani v rámci prvního, ani v rámci druhého postupu (viz Obrázek 7).

Obrázek 7: Příklad detekce PNRSV



(L: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas; 1 – 14: jednotlivé vzorky č. 1 – 14; B: blank)

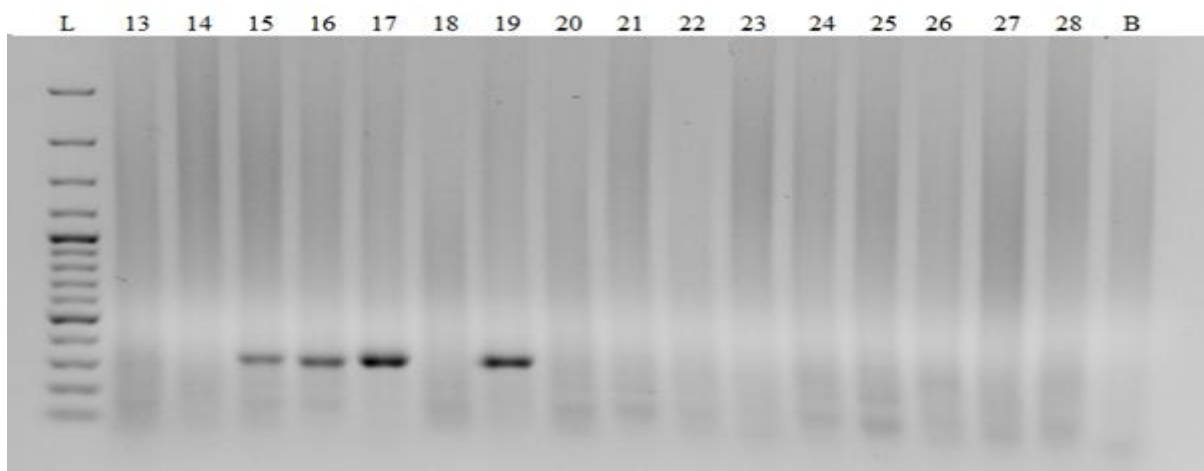
5.4 Detekce virů čeledi *Betaflexiviridae*

K detekci virů čeledi *Betaflexiviridae* byla použita RT-PCR a následná nested PCR s polyvalentními degenerovanými oligonukleotidy (PDO) podle Foissac a kol. (2005). Produkty o očekávané velikosti 362 bp byly získány u 4 vzorků, z nested PCR provedené s primery PDO-F2i/PDO-R1i (viz Obrázek 9). Tři z pozitivních vzorků byly původem ze švestek domácích rostoucích poblíž obce Šumice (vzorky č. 15, 16 a 17) a čtvrtý vzorek pocházel ze švestky domácí z Národního Parku Podují. Tyto stromy vykazovaly na listech chlorotické mozaiky, podobné infekci PPV (viz Obrázek 8).

Obrázek 8: Příznaky ACLSV na listech zplanělé švestky



Obrázek 9: Příklad detekce betaflexivirů pomocí PDO nested PCR s použitím nested primerů PDO-F2i/PDO-R1i



(L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas; čísla označují testované vzorky; B: blank)

Vzorky byly dále sekvenovány za použití specifických primerů F2i a R1i, ve všech případech se podařilo získat sekvence o velikosti 350 bp. Sekvence vykazovaly vzájemnou identitu v rozsahu 84-93%. Jejich porovnáním se sekvencemi z databáze GenBank pomocí BLAST bylo u všech prokázáno, že se jedná o sekvence viru *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Izoláty 153, 154, 155 a 158 (vzorky č. 15, 16, 17 a 19) se nejvíce podobaly izolátům ACLSV z Černé hory, infikujících *P. persica*. Nejvyšší identitu 84%, 85%, 81%, respektive 86% vykazovaly s izolátem ACLSV 369/11 (Acc. No. KF534759.1). Po zkrácení sekvencí na délku 289 bp, tj. bez okrajových částí příslušejících amplifikačním primerům vykazoval izolát 153 (vzorek č. 15) nejvyšší 84% identitu s izolátem ACLSV Z3 (Acc. No. JN634761) původem z Číny infikující *P. persica*. Izolát 154 (vzorek č. 16) vykazoval 85% identitu se sekvencí ACLSV P863 (Acc. No. M58152) získané ve Francii ze švestky domácí. Sekvence 155 (vzorek č. 17) vykazovala 75% identitu se sekvencí ACLSV PBM1 (Acc. No. AJ243438) pocházející z Německa infikující *P. domestica*. Izolát 158 (vzorek č. 19) vykazoval 83% identitu s již zmíněnou sekvencí ACLSV PBM1 (Acc. No. AJ243438) původem z Německa.

Fylogenetická analýza českých izolátů získaných v této práci a sekvencí ACLSV dostupných v databázi Genbank, založená na sekvencích o délce 289bp potvrdila jejich odlišnost (viz Obrázek 10). Jednotlivé izoláty se v dendrogramu sdružily do většího počtu statisticky průkazných i statisticky neprůkazných skupin. České izoláty vytvořily statisticky průkaznou samostatnou větev. Nejbližší příbuzné k nim jsou skupiny izolátů ACLSV získaných z *Prunus persica* v Černé Hoře, a z *P. domestica* v Německu, dále také francouzské izoláty z *P. armeniaca*, se kterými vytvořily samostatných klastr.

Ve fylogenetickém stromu jsou zřejmé i další výrazné skupiny. Druhou skupinu tvoří izoláty z hostitelů *P. avium*, *P. persica* a *Crataegus pinnatifida* pocházejících z různých zemí Evropy. Třetí skupina zahrnuje zejména izoláty z *Malus domestica* původem z asijských zemí (Čína, Indie, Japonsko) a tři izoláty z odlišných hostitelských rostlin (*P. avium*, *P. domestica*, *Vitis vinifera*) z Francie a Itálie. Čtvrtá skupina je tvořena izoláty z *P. persica* a *P. domestica* z Číny, Japonska, USA a Francie. Poslední skupina sdružuje izoláty z *Pyrus spp.* pocházejících z Číny.

Z fylogenetického stromu izolátů ACLSV vyplývá jistá hostitelská a geografická specifita. Izoláty ze švestek získané v rámci této práce vytvořily zřetelně jeden klaster, podobně vytvářely samostatné klastery izoláty ACLSV infikující jabloně (*Malus spp.*), meruňky (*P. armeniaca*) anebo broskvoně (*P. persica*). Hostitelskou specifitu naznačuje i fakt, že bootstrap hodnoty nabývají vysokých hodnot až u koncových větví, ze stejného důvodu ale nelze usuzovat na přesnější fylogenetické vztahy.

6 DISKUZE

PPV je na celém území České republiky široce rozšířen (Navrátil a Šafářová, 2015). Nejběžnějším hostitelem jsou švestky domácí a myrobalány, a to jak v sadech a soukromých zahradách, tak při okrajích cest (Navrátil a kol., 1998; Polák, 2007; Polák a Komínek, 2009). Trnky infikované PPV se objevují převážně v blízkosti napadených kulturních stromů a představují tedy sekundární zdroj infekce (Polák, 1997; Polák, 2002). V Evropě je výskyt PPV velice častý, zejména východní a střední část kontinentu je silně zamořena (Jarausch, 2006; Jevremović a Paunović, 2014; Dulic-Markovic a Jevremović, 2006; Kölber a Neméth, 2001; Malinowski, 2006; Matić a kol., 2006; Mikec a kol., 2006). V rámci této bakalářské práce byl PPV (podle očekávání) detekován, a to u 63,6 % testovaných švestek (*P. domestica*), u 28,6 % myrobalánů (*P. cerasifera*). U žádné ze zkoumaných trnek (*P. spinosa*), ale jeho přítomnost prokázána nebyla, což odpovídá aktuálně popisované situaci v České republice. Všechny detekované izoláty PPV byly určeny jako kmen PPV-D, což se shoduje s dosud provedenými studii. PPV-D je na našem území nejrozšířenějším kmenem PPV (Gadiou a kol., 2008; Navrátil a kol., 1998; Šafářová a kol., 2012), zatímco PPV-M a PPV-Rec se objevuje pouze na jižní Moravě (Gadiou a kol., 2008; Polák a Komínek, 2009; Šafářová a kol., 2012). PPV-M je navíc u švestek a myrobalánů velmi vzácný, vyskytuje se zejména u broskvoní, popřípadě meruněk (Polák, 2002; Šafářová a kol., 2011; Šafářová a kol., 2012).

PDV a PNRSV se v České republice historicky vyskytoval relativně často (Blatný, 1958; Paulechová a Baumgartnerová, 1970), což bylo potvrzeno v posledních letech. Jeho výskyt byl zaznamenán na třešních a višních (Navrátil a Šafářová, 2010), švestkách, myrobalánech i trnkách (Polák, 2007). V evropských zemích, zejména jižní Evropě byl zjištěn vyšší výskyt PDV a PNRSV, než je tomu v České republice. Naopak PPV je v zemích jižní Evropy méně častý, než na našem území, potažmo v celé střední a východní Evropě (Myrta a kol., 2003). Navzdory očekávání zjištěné výsledky toto nepotvrzují, v rámci této práce nebyla přítomnost PDV ani PNRSV prokázána v žádném z testovaných vzorků.

ACLSV byl v rámci této práce detekován u čtyř vzorků, všechny pocházely z kulturních švestek domácích, což odpovídá dosud publikovaným zjištěním. Sporadický výskyt ACLSV na švestkách byl v České republice již dříve zaznamenán v genofondové sbírce (Karešová a Paprštejn, 2001). Zřídka infikuje také planě rostoucí švestky a myrobalány, zatímco u trnek nebyl zaznamenán (Polák, 2007). Podobná situace byla popsána i v dalších evropských

zemích (Ciešlínska a kol., 1995; German a kol., 1990; German-Retana a kol., 1997; Mandić a kol., 2007; Pasquini a kol., 1998; Al Rwahnih a kol., 2004).

Fylogenetická analýza získaných izolátů ACLSV potvrdila jeho odlišnost od dosud zjištěných sekvencí a dříve popisovaný vysoký stupeň genetické variability. Ze získaného fylogenetického stromu je rovněž patrný široký hostitelský okruh ACLSV a jistý stupeň hostitelské specifity, který je dán genetickým rozrůžňováním jednotlivých izolátů viru v souvislosti s přizpůsobováním se hostiteli. Míra hostitelské a geografické specifity zaznamenaná dřívějšími studii ale není příliš vysoká. (Al Rwahnih a kol., 2004; Chen a kol., 2014; Katsiani a kol., 2014; Rana a kol., 2010). Z provedené analýzy však nejde usuzovat na hlubší evoluční vztahy, což naznačují bootstrap hodnoty, které potvrzují pouze koncové větve fylogenetického stromu. Pro pozici zjištěných izolátů by tedy bylo vhodné analyzovat delší úseky genomu ACLSV.

7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo analyzováno 28 stromů rodu *Prunus*, konkrétně 11 švestek (*P. domestica*), 7 myrobalánů (*P. cerasifera*) a 10 trnek (*P. spinosa*). Vzorke pocházely ze zplanělých a planých stromů, které se nevyskytovaly v blízkosti hospodářsky využívaných sadů. Byla testována přítomnost virů *Plum pox virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* a zástupců čeledi *Betaflexiviridae*. Viry byly detekovány pouze na švestkách a myrobalánech, nikoli na trnkách. V celém souboru vzorků byl prokázán výskyt PPV, a to u 63,6 % švestek a 28,6 % myrobalánů. PPV byl detekován na všech zkoumaných lokalitách a vždy se jednalo o kmen PPV-D. V rámci experimentů byla potvrzena také přítomnost méně běžného ACLSV, který byl zaznamenán na třech švestkách ze Šumic a jedné švestce z Národního Parku Podyjí. Získané izoláty byly sekvenovány a fylogeneticky analyzovány. Z vypracovaného fylogenetického stromu byl patrný určitý stupeň hostitelské specifity izolátů, evoluční vztahy však nebylo možné hodnotit. Výsledky potvrzují široké rozšíření PPV-D na slivoních a přinášejí zajímavé možnosti dalšího studia týkajícího se ACLSV detekovaného na zplanělých švestkách.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams, M., Antoniw, J., Bar-Joseph, M., Brunt, A., Candresse, T., Foster, G., Martelli, G., Milne, R., Fauquet, C. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149, 1045-1060.
- Adams, M., Antoniw, J.: DPVWeb – Descriptions of Plant Viruses [<http://www.dpvweb.net/>] (červenec 2015)
- Al Rwahnih, M., Turturo, C., Minafra, A., Saldarelli, P., Myrta, A., Pallás, V., Savino, V. (2004): Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology*, 86, 117-122.
- Alayasa, N., Al Rwahnih, M., Myrta, A., Herranz, M., Minafra, A., Boscía, D., Pallás, V. (2003): Identification and characterization of an American plum line pattern virus isolate from Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 85, 3-7.
- Amari, K., Burgos, L., Pallás, V., Sánchez-Pina, M. (2009): Vertical transmission of *Prunus* necrotic ringspot virus: Hitch-hiking from gametes to seedling. *Journal of General Virology*, 90, 1767-1774.
- Aparicio, F., Sánchez-Pina, M., Sánchez-Navarro, J., Pallás, V. (1999): Location of *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* within pollen grains of infected nectarine trees: Evidence from RT-PCR, dot-blot and in situ hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 623-627.
- Auger, J. (1989): Tomato ringspot virus (TOMRSV) associated with brownline disease of prune trees in Chile. *Acta Horticulturae*, 235, 197-204.
- Barone M., Alioto D., Marais A., Candresse T., Ragozzino A. (2006): First report and high prevalence in noncherry host of *Cherry virus A* in Italy. *Plant Disease*, 90, 1459.
- Blatný, C. (1958): Podmínky k rozšíření některých viróz ovocných rostlin v českých a moravských krajích. *Preslia* 30, 363.
- botany.cz (květen, 2015)
- Brown, D., Robertson, W., Trudgill, D. (1995): Transmission of viruses by plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 223-249.
- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L. (1996): *Viruses of Plants*. Wallingford: CAB International.
- Buchtová, I. (2014): *Ovoce: Situační a výhledová zpráva*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR. ISBN 978-80-7434-175-5.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llácer, G. (2006): *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO*, 36, 202-204.
- Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscía, D., Quiot, J., Dunez, J. (1998): Comparison of monoclonal antibodies and polymerase chain reaction assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox potyvirus. *Phytopathology*, 88, 198-204.

- Candresse, T., Liberti, D., Barone, M., Marais, A., Ragozzino, A. (2011): *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*. In: Hadidi, A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. (eds). *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*, 103-106. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Cieślińska M., Malinowski T., Zawadska B. J. (1995): Studies on several strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulturae*, 386, 63-71.
- Cieślińska, M. (2004): Detection of *Strawberry mottle virus* (SMoV) using RT-PCR – comparison of two RNA extraction methods. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12, 17-22.
- Crane, M., Lawrence, W. (1947): *The genetics of garden plants*. London: MacMillan(and)CO. LTD. 299s.
- Dallot, S., Glasa, M., Jevremović, D., Kamenova, I., Paunovic, S., Labonne, G. (2011): Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *Plum pox virus* strain M. *Archives of Virology*, 156, 539-542.
- Damsteegt, V., Scorza, R., Stone, A., Schneider, W., Webb, K., Demuth, M., Gildow, F. (2007): *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91, 18-23.
- Di Terlizzi, B., Skrzeczkowski, L., Mink, G., Scott, W., Zimmerman, M. (2001): The RNA 5' of *Prunus necrotic ringspot virus* is a biologically inactive copy of the 3'-UTR of the genomic RNA 3. *Archives of Virology*, 146, 825-833.
- Diekmann, M., Putter, C. (1996): *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm*. No. 16. Stone Fruits. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Domingo, E., Holland, J. (1997): RNA virus mutation and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology*, 51, 151-169.
- Dulic-Markovic, I., Jevremovic, D. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Serbia. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 213.
- Dunez, J., Marenaud, G., Delbos, R., Lansac, M. (1972): Variability of symptoms induced by the *Apple chlorotic leaf spot virus* (CLSV). A type of CLSV probably responsible for bark split disease of prune trees. *Plant Disease Reporter*, 56, 293-295.
- EPPO (1990): Schéma pro produkci zdravých sazenic: Certifikační schéma pro mandloň, meruňku, broskvoň a švestku. OEPP/EPPO.
- EPPO (2015): European and Mediterranean Plant Protection Organization. [online].[cit.2015-04-04]. http://www.eppo.int/QUARANTINE/documented_pests.html.
- Fauquet, C., Ball, L., Desselberger, U., Maniloff, J., Mayo, M. (2005): *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego – London: Elsevier Academic Press.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.-J., Marais, A., Candresse, T. (2005): Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: A polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses, and foveaviruses. *Phytopathology*, 95, 617-625.

- Fry, P., Wood, G. (1971): Prunus necrotic ringspot and Prune dwarf viruses in New Zealand. *Journal of Agricultural Research*, 14, 515-525.
- Fry, P., Wood, G. (1978): Two berry fruit diseases newly recorded in New Zealand. *Journal of Agricultural Research*, 21, 543-547.
- Gadiou, S., Šafářová, D., Navrátil, M. (2008): Genetic variability of *Plum pox virus* isolates in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 513-517.
- García, J., Glasa, M., Cambra, M., Candresse, T. (2014): *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15, 226-241.
- German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J., Pernollet, J., Dunez, J. (1990): Nucleotide sequence and genomic organization of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology*, 179, 104-112.
- German-Retana, S., Bergey, B., Delbos, R., Candresse, T., Dunez, J. (1997): Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). *Archives of Virology*, 142, 833-841.
- Gispert, C., Oldfield, G., Perring, T., Creamer, R. (1998): Biology of the transmission of peach mosaic virus by *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae). *Plant Disease*, 82, 1371-1374.
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajňa, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczuk, L., Candresse, T. (2011): Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. *Phytopathology*, 101, 980-985.
- Glasa, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., Šubr, Z. (2004): Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *Journal of General Virology*, 85, 2671-2681.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M., Candresse, T. (2013): Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103, 972-979.
- Greber, R., Teakle, D. (1992): Thrips-Facilitated Transmission of Prune Dwarf and Prunus Necrotic Ringspot Viruses from Cherry Pollen to Cucumber. *Plant Disease*, 76, 1039-1041.
- Grimová, L., Zouhar, M., Ryšánek, P., Drabešová, J., Mazáková, J., Paprštejn, F. (2010): First occurrence of *Cherry virus a* (cva) in the Czech Republic. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, 275-277.
- Guo, D., Maiss, E., Adam, G., Casper, R. (1995): Prunus necrotic ringspot ilarvirus: nucleotide sequence of RNA3 and the relationship to other ilarviruses based on coat protein comparison. *Journal of General Virology*, 76, 1073-1079.
- Hansen, A., Nyland, G., McElroy, F., Stace-Smith, R. (1974): Origin, cause, host range and spread of cherry rasp leaf disease in North America. *Phytopathology*, 64, 721-727.
- Harrison, B. (1957): Studies of the host range, properties and mode of transmission of *Beet ringspot virus*. *Annals of Applied Biology*, 45, 462-472.

- Horáček, P. (2007): Encyklopedie listnatých stromů a keřů. Brno: Computer Press, a. s. 747s. ISBN-80-251-1708-8
- Hoy, J., Mircetich, J., Bethell, R., DeTar, J., Homberg, D. (1984): The cause and control of prune brownline disease. *California Agriculture*, 38, 12-13.
- Chen, S., Zhou, Y., Ye, T., Hao, L., Guo, L., Fan, Z., Li, S., Zhou, T. (2014): Genetic variation analysis of apple chlorotic leaf spot virus coat protein reveals a new phylogenetic type and two recombinants in China. *Archives of Virology*, 159, 1431-1438.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A. (2013): Detection and partial molecular characterization of atypical plum pox virus isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158, 1383-1387.
- Choueiri, E., Myrta, A., Herranz, M., Hobeika, C., Digiario, M., Pallás, V. (2006): First report of *American plum line pattern virus* in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, 88, 227.
- Christensen, O., Paludan, N. (1978): Growth and flowering of pelargonium infected with tomato ringspot virus. *Journal of Horticultural Science*, 53, 209-213.
- 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.
- Iwaki, M., Komuro, Y. (1971): Viruses isolated from narcissus species in Japan. II. *Tomato ringspot virus* and its transmission by *Xiphinema americana*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 39, 108-116.
- Iwaki, M., Komuro, Y. (1974): Viruses isolated from narcissus (*Narcissus* spp.) in Japan. V. *Arabis mosaic virus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 40, 344-353.
- James, D., Thompson, D. (2006): Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 222-224.
- James, D., Varga, A., Thompson, D., Hayes, S. (2003): Detection of a new and unusual isolate of *Plum pox virus* in plum (*Prunus domestica*). *Plant Disease*, 87, 1119-1124.
- Jarausch, W. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Germany. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 209.
- Jevremović, D., Paunović, S. (2014): *Plum pox virus* strains: diversity and geographical distribution in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 29, 97-107.
- Jones, A., Wood, G. (1978): The occurrence of cherry leaf roll virus in red raspberry in New Zealand. *Plant Disease Reporter*, 62, 835-838.
- Jridi, Ch., Martin, J.-F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Blanc, S. (2006): Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *Journal of Virology*, 80, 2349-2357.
- Kalashyan, Y., Bilkey, N., Verderevskaya, T., Rubina, E. (1994): *Plum pox virus* on sour cherry in Moldava. *EPPO Bulletin*, 24, 645-649.

- Karešová, R., Paprštejn, F. (2001): *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulturae*, 550, 259-264.
- Katsiani, A., Maliogka, V., Candresse, T., Katis, N. (2014): Host-range studies, genetic diversity and evolutionary relationships of ACLSV isolates from ornamental, wild and cultivated Rosaceous species. *Plant Pathology*, 63, 63-71.
- King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. (2011): *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Academic Press.
- Kirby, M., Kirby, M., Adams, A. (2001): Occurrence of *Cherry Virus A* in the UK. *Plant Pathology*, 50, 801.
- Kölber, M., Neméth, M. (2001): Current situation of plum pox disease on stone fruit species in middle and eastern Europe. *Acta Horticulturae*, 550, 73-77.
- Komorowska, B., Cieślińska, M. (2004): First Report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant Disease*, 88, 909.
- Lenz, O., Petrzik, K., Spak, J. (2008): Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses. *Journal of Virological Methods*, 148, 96-105.
- Liberti, D., Marais, A., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M., Alioto, D., Ragozzino, A., Rodoni, B., Candresse, T. (2005): Characterization of Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus, A Novel Trichovirus Isolated from Stone Fruit Trees. *Phytopathology*, 95, 420-426.
- Lister, R. (1960): Occurrence of soil-borne virus diseases of strawberry in Britain. *Plant Pathology*, 9, 102-105.
- Llácer, G. (2006): Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 227-228.
- Llácer, G., Cambra, M. (2006): Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 219-221.
- Lockhart, B. (2006): Occurrence of *Arabidopsis mosaic virus* in Hostas in the United States. *Plant Disease*, 90, 834.
- Malinowski, T. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Poland. *OEPP/EPPO Bulletin*, 36, 212.
- Mandic, B., Matić, S., Al Rwahnih, M., Jelkmann, W., Myrta, A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 89, 103-108.
- Marais, A., Svanella-Dumas, L., Barone, M., Gentit, P., Faure, C., Charlot, G., Ragozzino, A., Candresse, T. (2012): Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of *Cherry capillovirus A*. *Plant Pathology*, 61, 195-204.
- Marbot, S., Salmon, M., Vendrame, M., Huwaert, A., Kummert, J., Dutrecq, O., Lepoivre, P. (2003): Development of Real-Time RT-PCR assay for detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in fruit trees. *Plant Disease*, 87, 1344-1348.
- Martelli, G., Adams, M., Kreuzer, J., Dolja V. (2007): Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 73-100.

- Matić, S., Durić, G., Myrta, A. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Bosnia and Herzegovina. OEPP/EPPO Bulletin, 36, 205.
- Mekuria, G., Ramesh, S., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., Sedgley, M. (2003): Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). Journal of Virological Methods, 114, 65-69.
- Mikec, I., Kajić, V., Križanac, I. (2006): *Plum pox virus* (PPV) in Croatia. OEPP/EPPO Bulletin, 36, 207.
- Mink, G. (1993): Pollen- and Seed- Transmitted Viruses and Viroids. Annual Review of Phytopathology, 31, 375-402.
- Mircetich, S., Hoy, J. (1981): Brownline of prune trees, a disease associated with tomato ringspot virus infection of myrobalan (plum) and peach rootstocks. Phytopathology, 71, 30-35.
- Myrta, A., Abbadi, H., Herranz, M., Al-Rwahneh, M., Di-Terlizzi, B., Minafra, A., Pallás, V. (2002): First report of *American plum line pattern virus* (APLPV) in Albania, Italy and Tunisia. Journal of Plant Pathology, 84, 188.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V., Martelli, G. (2003): Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys. In: Myrta, A. a kol. (eds). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. Options Méditerranéennes. Serie B: Studies and Research No. 45.
- Navrátil, M., Šafařová, D. (2010): Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* in wild cherries in the locality velehrad (South Moravia, Czech Republic). Julius-Kühn-Archiv, 427, 278-280.
- Navrátil, M., Šafařová, D. (2015): An overview of sharka and its research in the Czech Republic. Acta Horticulturae, 1063, 21-28.
- Navrátil, M., Šimonová, V., Fialová, R., Válová, P. (1998): Molecular variability of Czech plum pox virus isolates. Acta Virologica, 42, 254-256.
- Nemeth, M. (1986): Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Dordrecht: Martinus Nijhoff.
- Niu, F., Pan, S., Wu, Z., Jiang, D., Li, S. (2012): First report of *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infection of peach in China. Journal of Plant Pathology, 94, 86.
- Niu, F., Pan, S., Wu, Z., Jiang, D., Li, S. (2012): Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus domestica*) in China. Archives of Virology, 157, 783-786.
- Noorani, M., Awasthi, P., Singh, R., Ram, R., Sharma, M., Singh, S., Ahmed, N., Hallan, V., Zaidi, A. (2010): Complete nucleotide sequence of cherry virus A (CVA) infecting sweet cherry in India. Archives of Virology, 155, 2079-2082.

- Oldfield, G., Creamer, R., Gispert, C., Osorio, F., Rodriguez, R., Perring, T. (1995): Incidence and Distribution of Peach Mosaic and Its Vector *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae) in Mexico. *Plant Disease*, 79, 186-189.
- Pallás, V., Aparicio, F., Herranz, M., Amari, K., Sanchez-Pina, Myrta, A., Sanchez-Navarro, J. (2012): Iarviruses of *Prunus* spp.: A Continued Concern for Fruit Trees. *Phytopathology*, 102, 1108-1120.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., Candresse, T. (2012): An atypical Albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcus strain. V 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, June 3-8 Rome, Book of Abstracts, 33.
- Palmisano, F., Minafra, A., Myrta, A., Boscia, D. (2015): First report of Plum pox virus strain PPV-T in Albania. *Journal of Plant Pathology*, doi: 10.4454/JPP.V97I2.025.
- Pasquini, G., Faggioli, F., Pilotti, M., Lumia, V., Barba, M. (1998): Characterisation of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Italy. *Acta Horticulturae*, 472, 195-199.
- Paulechová, K., Baumgartnerová, H. (1970): Spread of viruses of ring spot group on stone fruits in Czechoslovakia. In: *Plant Virology. Proc. 7th Conf. Czechoslovak Plant Virologists*, 113-119. High Tatras, Czechoslovakia, 1971, 113-119.
- Pine, T. (1976): Peach mosaic. In: Gilmer, R., Moore, J., Nyland, G., Welsh, M., Pine, T. (eds). *Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America*, 61-70. U.S. Dep. Agric. Handbook No. 437.
- Polák, J. (1997): The role of *Prunus spinosa* L. in epidemiology of *Plum pox virus* in the Czech Republic. In: Dehne, H. a kol. (eds). *Diagnosis and identification of plant pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Polák, J. (2002): Distribution of *Plum pox virus* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38, 98-102.
- Polák, J. (2007): Viruses of Blackthorn and Road-Bordering Trees of Plum, Myrobalan, Sweet and Sour Cherries in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 43, 1-4.
- Polák, J., Komínek, P. (2009): Distribution of *Plum pox virus* strains in natural sources in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 45, 144-147.
- Pospieszny, H., Borodynko, N., Jonczyk, M. (2004): First report of *Tomato black ring virus* (TBRV) in the natural infection of *Sambucus nigra* in Poland. *Journal of Plant Protection Research*, 44, 373-376.
- Rakhshandehroo, F., Zamani Zadeh, H., Modarresi, A., Hajmansoor, S. (2006): Occurrence of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. *Plant Disease*, 90, 975.
- Rampitsch, C., Eastwell, K. (1997): The complete nucleotide sequence of prune dwarf ilarvirus RNA-1. *Archives of Virology*, 142, 1911-1918.
- Rana, T., Chandel, V., Kumar, Y., Ram, R., Hallan, V., Zaidi, A. (2010): Molecular variability analyses of *Apple chlorotic leaf spot virus* capsid protein. *Journal of Biosciences*, 35, 605-615.

- Rydén, K. (1972): *Pelargonium* ringspot – a virus disease caused by tomato ringspot virus in Sweden. *Journal of Phytopathology*, 73, 178-182.
- Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Rowhani, A., Grant, J., Uyemoto, J. (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.
- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R. (2009): Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Archives of Virology*, 154, 899-907.
- Sánchez-Navarro, J., Pallás, V. (1997): Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of *prunus necrotic ringspot virus* RNA 3. *Archives of Virology*, 142, 749-763.
- Sheveleva, A., Ivanov, P., Prihodko, Y., James, D., Chirkov, S. (2012): Occurrence and genetic diversity of Winona-Like *Plum pox virus* isolates in Russia. *Plant Disease*, 96, 1135-1142.
- Shiel, P., Berger, P. (2000): The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to *Alfalfa mosaic virus* than to other ilarviruses. *Journal of General Virology*, 81, 273-278.
- Shiel, P., Alrefai, R., Domier, L., Korban, S., Berger, P. (1995): The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* RNA-3. *Archives of Virology*, 140, 1247-1256.
- Suchá, J., Svobodová, L. (2010): Incidence of *Prune dwarf virus* and *Prunus necrotic ring spot virus* in orchards of sweet and sour cherry in the Czech Republic – Short communication. *Horticultural Science*, 37, 118-120.
- Svanella-Dumas, L., Marais A., Gentil P., Lamorte J., Candresse T. (2005): First report on the natural occurrence of *Cherry virus A* in Mirabelle plum (*Prunus domestica* var. *insititia*). *Plant Disease*, 89, 443.
- Šafářová, D., Navrátil, M. (2012): First report of *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* Infecting Plum (*Prunus domestica*) in the Czech Republic. *Plant Disease*, 96, 461.
- Šafářová, D., Gadiou, S., Navrátil, M. (2011): PPV-M Monitoring in and out of intensive orchards in South Moravia. *Acta Horticulturae*, 899, 45-48.
- Šafářová, D., Gadiou, S., Navrátil, M. (2012): Occurrence of *Plum pox virus* strains in Moravia (Czech Republic). *Petria* 22, 250.
- Šafářová, D., Navrátil, M., Paprštěin, F., Candresse, T., Marais, A. (2013): *Cherry virus A* infecting cherries and plums in the Czech Republic – Short communication. *Horticultural Science*, 40, 37-39.
- Šubr, Z., Pittnerová, S., Glasa, M. (2004): A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48, 173-176.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- Usenik, V., Kastelec, D., Stampar, F., Marn, M. (2015): Effect of *Plum pox virus* on chemical composition and fruit quality of plum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 51-60.
- Uyemoto, J., Scott, S. (1992): Important Diseases of *Prunus* Caused by Viruses and Other Graft-Transmissible Pathogens in California and South Carolina. *Plant Disease*, 76, 5-10.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro M., Dunez, J. (1992): A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39, 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R., Mazyad, H., Aboul-Ata, A., Dunez, J. (1991): Nucleotide sequence of the 3'terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology*, 72, 1741-1746.
- Wetzel, T., Krczal, G. (2007): Molecular biology of *Raspberry ringspot nepovirus*. *Plant Viruses*, 1, 45-51.
- Wilson, N., Jones, L., Cochran, L. (1955): An eriophyid mite vector of the peach mosaic virus. *Plant Disease Reporter*, 39, 889-892.
- Yardimci, N., Çulal, H. (2009): Occurrence and incidence of *Prunus necrotic ringspot virus*, *Arabis mosaic virus*, and *Apple mosaic virus* on oil rose (*Rosa damascena*) in the Lakes region of Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37, 95-98.