

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Kateřina Beierová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Izolace a analýza dsRNA z viry infikovaných
rostlin**

Bakalářská práce

Kateřina Beierová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc., s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

SOUHRN

Bakalářská práce se věnuje využití dvouvláknové RNA (double-stranded RNA, dsRNA) při studiu rostlinných RNA virů.

V teoretické části jsou popsány rostlinné RNA viry, které jsou rozděleny do 3 skupin podle replikační strategie na (+)ssRNA viry, (-)ssRNA viry a dsRNA viry. U každé skupiny je uvedena stručná charakteristika genomu, způsob jejich replikace a jsou představeni nejvýznamnější zástupci daných skupin. Druhá část je věnována významu dsRNA pro detekci a identifikaci rostlinných virů a metodám studia virové dsRNA jako je např. izolace dsRNA, diagnostika virů pomocí jejich dsRNA profilů, RT-PCR, molekulární klonování a sekvenování genomu RNA virů s využitím klasických metod sekvenování i sekvenování nové generace. Na závěr teoretické části je uvedena charakteristika rodu *Luteovirus* a zástupců tohoto rodu infikujících dřeviny – *Nectarine stem pitting-associated virus*, *Cherry-associated luteovirus* a *Rose spring dwarf-associated luteovirus*.

Cílem experimentální části byla izolace dsRNA z viry infikovaných rostlin a jejich identifikace. Ve stromu višně se podařilo identifikovat *Nectarine stem pitting-associated virus* a získat částečnou genomickou sekvenci ORF 3, ORF 5 a část 3' nepřekládané oblasti genomu.

SUMMARY

This bachelor's thesis deals with the use of double-stranded RNA (dsRNA) in the study of plant RNA viruses.

In the theoretical part, plant RNA viruses are described and divided into 3 groups according to the replication strategy. The groups are (+) ssRNA viruses, (-) ssRNA viruses and dsRNA viruses. For each group there is a brief description of the genome, the way the genomes are replicated, and the most prominent representatives of the groups are presented. The second part concentrates on the importance of the dsRNA for the detection and identification of plant viruses and on the methods of viral dsRNA study such as dsRNA isolation, virus diagnosis based on usage of their own dsRNA patterns, RT-PCR, molecular cloning and sequencing of RNA genome using traditional methods of sequencing and next generation sequencing. At the end of the theoretical part, we are introducing the characteristics of the genus *Luteovirus* and of the members of this species which infects the woody species – *Nectarine stem pitting-associated virus*, *Cherry-associated luteovirus* and *Rose spring dwarf-associated luteovirus*.

The aim of the experimental part was to isolate the dsRNA from the infected plants and to identify them. We were able to identify the *Nectarine stem pitting-associated virus* in the sour cherry tree and we succeeded in obtaining the partial genomic sequence of ORF 3, ORF 5 and part of 3' untranslated region.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc., za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnoval. Mé poděkování patří také pracovníkům Laboratoře molekulární biologie a mikroorganismů za pomoc při zpracování experimentální části. Děkuji Interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA_ PrF_2016_003) za podporu.

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
2	ÚVOD	8
3	CÍLE PRÁCE	9
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
4.1	RNA viry	10
4.1.1	(+)ssRNA viry	10
4.1.2	(-)ssRNA viry	11
4.1.3	dsRNA viry	12
4.2	Přítomnost dsRNA u viry infikovaných rostlin.....	13
4.2.1	Distribuce a výskyt dsRNA v rostlinných buňkách a pletivech	13
4.3	Metody studia virové dsRNA.....	14
4.3.1	Izolace dsRNA	14
4.3.2	Detekce a identifikace rostlinných virů pomocí dsRNA profilů	17
4.3.3	Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) a molekulární klonování	17
4.3.4	Sekvenování genomu RNA virů.....	18
4.4	Charakteristika rodu <i>Luteovirus</i>	20
4.4.1	Molekulární charakteristika <i>Nectarine stem pitting-associated virus</i>	20
4.4.2	Molekulární charakteristika <i>Cherry-associated luteovirus</i>	21
4.4.3	Molekulární charakteristika <i>Rose spring dwarf-associated virus</i>	21
5	MATERIÁL A METODY	23
5.1	Biologický materiál	23
5.2	Izolace dsRNA	23
5.3	RT-PCR.....	24
5.4	Elektroforetická separace	24
5.5	Izolace PCR produktu z gelu.....	25
5.6	Klonování PCR produktu	25
5.7	Sekvenování	27
5.8	Bioinformatická analýza	28
5.9	Použité chemikálie a roztoky	29
5.10	Použité kity.....	29
5.11	Použité přístroje.....	30
6	VÝSLEDKY	31
7	DISKUZE.....	42
8	ZÁVĚR.....	45
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(-)ssRNA	single-strand RNA (jednovláknová RNA) s negativní polaritou
(+)ssRNA	single-strand RNA (jednovláknová RNA) s pozitivní polaritou
BChV	<i>Beet chlorosis virus</i>
BLRV	<i>Bean leafroll virus</i>
BYDV-GAV	<i>Barley yellow dwarf virus-GAV</i>
BYDV-KerII	<i>Barley yellow dwarf virus-kerII</i>
BYDV-MAV	<i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i>
BYDV-PAS	<i>Barley yellow dwarf virus-PAS</i>
BYDV-PAV	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CVEV	<i>Citrus vein enation virus</i>
CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOP	degenerované oligonukleotidové primery
DRB4	dsRNA „binding“ proteinu 4
dsRNA	double stranded RNA (dvouvláknová RNA)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GST	glutation-S-transferázy
ChaLV	<i>Cherry-associated luteovirus</i>
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
mRNA	mediátorová RNA
NGS	next generation sequencing (sekvenování nové generace)
NSPaV	<i>Nectarine stem pitting-associated virus</i>
ORF	open reading frame (otevřený čtecí rámec)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PEMV-1	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
PLRV	<i>Potato leafroll virus</i>
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RSDaV	<i>Rose spring dwarf-associated virus</i>
RT	reverzní transkripce
SbDV	<i>Soybean dwarf virus</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)
STE	sodium chloride Tris EDTA (chlorid sodný Tris EDTA) pufr
ssRNA	single-stranded RNA (jednovláknová RNA)
TAE	Tris acetate EDTA (Tris-acetátový EDTA) pufr
TuYV	<i>Turnip yellows virus</i>

2 ÚVOD

RNA viry představují asi 90 % všech známých rostlinných virů. Jedná se o nebuněčné parazity, kteří infikují rostlinné buňky a u řady užitkových i okrasných rostlin vyvolávají závažné choroby. Detekce a identifikace rostlinných RNA virů je zásadní pro prevenci virových onemocnění a následnou léčbu rostlin.

K diagnostice rostlinných RNA virů se v minulosti používaly metody založené na hodnocení příznaků, které se na rostlinách vyskytovaly nebo na identifikaci virových částic pomocí mikroskopie. V současné době nacházejí uplatnění například sérologické metody, ale začínají převládat metody molekulární biologie, které se soustředí na analýzu nukleových kyselin.

Výhodnou strategií při studiu rostlinných RNA virů je izolace a analýza dvouvláknové RNA (double-stranded RNA, dsRNA). Molekula dsRNA představuje genom dsRNA virů a také vzniká jako meziprodukt při replikaci virů s jednovláknovou RNA. Dvouvláknová RNA se u zdravých rostlin vyskytuje v nedetekovatelných množstvích. Pokud je v rostlině přítomna dsRNA o velikosti více než 0,5 kb, je velká pravděpodobnost, že je tato rostlina infikovaná RNA viry. Izolovaná dsRNA po separaci v gelu vytváří charakteristické dsRNA profily, které jsou specifické pro druhy, případně rody a čeledi RNA virů. Z tohoto důvodu je studium dsRNA vhodnou metodou pro diagnostiku RNA virů (Dodds *et al.*, 1984). Izolace virové dsRNA z rostlinného materiálu a využití dalších metod jako je polymerázová řetězová reakce, molekulární klonování a sekvenování se stává standardním postupem pro popis nových rostlinných RNA virů.

3 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma „Využití dsRNA při studiu rostlinných virů“.
- Zvládnutí metod: izolace dsRNA, RT-PCR, sekvenování, bioinformatika, elektroforéza v agarózovém gelu.
- Izolace dsRNA z viry infikovaných rostlin, jejich identifikace pomocí RT-PCR a sekvenování.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 RNA viry

RNA viry jsou velmi různorodou skupinou nebuněčných organismů a tvoří většinu všech známých virů. Skládají se z nukleové kyseliny a kapsidy. Jejich genom je tvořen ribonukleovou kyselinou (RNA), která může být buď jednovláknová (single-stranded, ss) nebo dvouvláknová (double-stranded, ds). Podle organizace genomu a replikační strategie můžeme dělit RNA viry do čtyř základních skupin:

1. (+)ssRNA viry – viry, u kterých je genom tvořen jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou,
2. (-)ssRNA viry – viry, u kterých je genom tvořen jednovláknovou RNA s negativní polaritou,
3. dsRNA viry – viry, u kterých je genom tvořen dvouvláknovou RNA,
4. ssRNA-RT viry – viry, u kterých je genom tvořen jednovláknovou RNA a disponují schopností přepsat svou RNA do dsDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy a začlenit ji do genomu hostitele.

Zástupci rostlinných virů se nacházejí pouze v prvních třech skupinách. Dvouvláknová RNA se pak vyskytuje také pouze u těchto tří skupin. U dsRNA virů, kde dvouvláknová RNA představuje genom a u (+)ssRNA virů a (-)ssRNA virů, kde tato molekula vzniká jako replikační meziproduct.

4.1.1 (+)ssRNA viry

(+)ssRNA viry jsou nejpočetnější skupinou RNA virů a tudíž skupinou velmi různorodou. Genom RNA virů tvořený jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou lze charakterizovat jako lineární, u některých čeledí může být segmentovaný. Velikost se pohybuje od 2,3 kb do 31,0 kb (Anonymous 1).

Po proniknutí virionu do buňky většinou prostřednictvím vektoru dojde jeho rozbalení a genové expresi. Existují dvě strategie replikace a exprese genetické informace u (+)ssRNA virů:

1. Virová RNA je přímo využita jako mediátorová RNA (mRNA) a je překládána do sekvence aminokyselin za vzniku polypeptidu, který musí být následně rozštěpen na jednotlivé proteiny. Tyto proteiny pak plní funkci stavební a tvoří

kapsidu, ale vytvářejí se také nestavební proteiny, které se dále účastní replikace. Jedním z nich je RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp). Působením tohoto enzymu je vytvořena komplementární jednovláknová negativní RNA, která slouží jako templát pro opětovnou syntézu virové (+)ssRNA. Tím, že se zde vytváří RNA vlákna s negativní polaritou, vznikají dvouvláknové replikační meziprodukty. (Ahluquist, 2006; Miller *et Koev*, 2000). dsRNA meziprodukt, který je po celé délce dvouvláknový, bývá označován jako „replicative form“ a dsRNA meziprodukt, který je částečně jednovláknový a částečně dvouvláknový se označuje „replicative intermediate“ (Buck, 1999). Tento způsob exprese genomu se vyskytuje například u *Picornavirales* (Dougherty *et Semler*, 1993).

2. S druhou strategií exprese genomu se setkáváme např. u čeledi *Alphaflexiviridae*. K vytvoření (+)ssRNA je potřeba dvou cyklů translace. V prvním cyklu translace je syntetizován polypeptid, jehož rozštěpením vznikají pouze nestavební proteiny, které se podílejí na replikaci genomické RNA např. RdRp. Po této replikaci vzniká mRNA, která není identická s genomickou a nazývá se subgenomická RNA. Její translací vzniká další polypeptid, jehož segmenty tvoří stavební proteiny. Přítomnost těchto dvou cyklů je důležitá pro oddělení rané a pozdní fáze exprese při infekci (Anonymous 2).

(+)ssRNA viry představují asi třetinu všech známých virů a jsou rozčleněny do 3 řádů a 31 čeledí. Řády *Picornavirales* a *Tymovirales* zahrnují rostlinné viry. Do *Picornavirales* a čeledi *Secoviridae* patří viry velmi často se vyskytující a napadají široké spektrum hostitelů. Jedná se o *Arabid mosaic virus*, *Cherry leaf roll virus* nebo *Tomato ringspot virus*. (Sanfacon *et al.*, 2009). *Tymovirales* zahrnuje tři čeledi *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae* a *Tymoviridae*. Ze zástupců tohoto řádu mohou být uvedeni například *Cherry virus A*, *Apple chlorotic leaf spot virus* a *Potato latent virus*, které infikují hospodářsky významné druhy rostlin a dřevin. Mezi rostlinné (+)ssRNA viry zařazujeme dalších 5 čeledí, které nejsou zařazeny do daného řádu: *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae* a *Tombusviridae* (ICTV, 2015).

4.1.2 (-)ssRNA viry

U rostlinných (-)ssRNA virů je uložena genetická informace v molekule RNA s negativní polaritou. Velikost genomu (-)ssRNA virů se pohybuje v rozmezí od 1,6 kb do 25,2 kb. Genom je lineární a u některých virů může být segmentovaný (Anonymous 3).

Způsob replikace (-)ssRNA virů se liší právě podle toho, zda mají segmentovaný nebo nesegmentovaný genom. Ovšem v obou případech dochází ke vzniku mRNA, která je pozitivně orientovaná a dočasně tak vznikají dvouvláknové meziprodukty. Tato molekula pak slouží jak pro syntézu proteinu, tak jako templát pro vznik genomické (-)ssRNA (Bustamante *et al.*, 1998; Kormelink *et al.*, 2011).

Rostlinné (-)ssRNA viry členíme do 3 čeledí - *Bunyaviridae*, *Ophioviridae*, *Rhabdoviridae* a dvou rodů - *Emaravirus* a *Tenuivirus*. Nejpočetnější čeleď *Bunyaviridae* primárně zahrnuje viry vyskytující se u zvířat a pouze 1 rod z celkových pěti této čeledi představuje viry rostlinné. Jde o rod *Tospovirus* a typovým druhem patřícím do tohoto rodu je *Tomato spotted wilt virus*, jehož genom byl popsán už v roce 1991 (De Haan *et al.*, 1991; Kormelink *et al.*, 1992). Rody *Tospovirus* a *Tenuivirus* jsou charakteristické tím, že jejich genom z části obsahuje (+)ssRNA a z části (-)ssRNA. Tudíž ta část genomu, která má pozitivní polaritu, je přímo překládána, zatímco část s negativní polaritou – část komplementární - musí být přepsána do molekuly mRNA a až poté zde probíhá translace. Takové viry pak nazýváme ambisense RNA viry (Nguyen *et al.*, 2002). Mezi rostlinné viry rodu *Tospovirus* patří např. *Tomato spotted wilt tospovirus* a do rodu *Tenuivirus* zástupce *Rice stripe virus* (ICTV, 2015).

4.1.3 dsRNA viry

dsRNA viry jsou skupinou virů, které charakterizuje přítomnost ikosaedrického uspořádání proteinového pláště a velikost virových částic pohybující se od 18 do 360 nm. Jejich genom je tvořen dvouvláknovou RNA a je lineární. Genom dsRNA virů je často segmentovaný a je zde značná variabilita v počtu těchto segmentů (Mertens, 2004).

Replikační cyklus dsRNA virů probíhá uvnitř hostitelské buňky, do které se viriony u rostlinných buněk nejčastěji dostávají pomocí vektoru. V procesu transkripce je každý segment RNA přepisován jednotlivě enzymem RNA-dependentní RNA polymerázou a vzniká (+)ssRNA. Následuje translace a vzniká polypeptid, který tvoří proteiny kapsidy. RNA s pozitivní polaritou je také využita jako templát pro vznik RNA s negativní polaritou a tím může vzniknout dvouvláknová RNA tvořící genom těchto virů (Patton *et al.*, 2000). Protože eukaryotické buňky mají vyvinuty způsoby, jak deaktivovat dvouvláknovou RNA, kterou považují za cizorodou, replikace probíhá uvnitř ikosaedrické kapsidy (Anonymous 4).

Podle ICTV (2015) se dsRNA viry řadí do jedenácti čeledí, z nichž 4 zahrnují viry napadající rostliny - *Amalgaviridae*, *Endornaviridae*, *Partitiviridae* a *Reoviridae*.

Nejvíce početně zastoupenou skupinou jsou *Reoviridae*. Genom *Reoviridae* se skládá z 10 až 12 segmentů, které kódují 10 až 14 proteinů. Velikost jejich genomu odpovídá od 18,2 kb do 30,5 kb (Anonymous 5). Do čeledi *Reoviridae* jsou zařazeny tyto viry - *Rice dwarf virus*, *Maize rough dwarf virus* nebo *Garlic dwarf virus*. Mezi jejich typické projevy patří zakrslost a četné deformace u napadených rostlin. Druhou nejpočetnější skupinou jsou *Partitivirae* způsobující virová onemocnění u rostlin a hub. Za zmínku také stojí čeleď *Endornaviridae*, jejichž zástupci napadají hospodářsky významné druhy jako je například rýže setá, bob obecný a fazol obecný (ICTV, 2015).

4.2 Přítomnost dsRNA u viry infikovaných rostlin

Morris *et* Dodds (1979) poprvé popsali přítomnost dvouvláknové RNA ve virem infikovaných rostlinných pletivech. dsRNA izolovali z rostlin napadených viry *Turnip yellow mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus* a dalšími (+)ssRNA viry. Izolovaná dsRNA pak posloužila jako výchozí materiál pro gelovou elektroforézu a zjistili, že každý z testovaných virů vytvořil po separaci v gelu charakteristický profil (dsRNA profil) podle počtu a velikosti viru specifických dsRNA. Došli tedy k závěru, že tento postup je vhodný pro detekci a identifikaci RNA virů. V dalším studiu virově specifické dvouvláknové RNA pokračovali Valverde *et al.* (1990). Vycházeli ze stejného předpokladu, a to, že pomocí dsRNA profilu lze taxonomicky zařadit RNA. Genom viru, který obsahuje jednu ssRNA molekulu by měl tvořit jeden hlavní dsRNA produkt o velikosti dvojnásobku molekulové hmotnosti ssRNA. Avšak při testování byly detekovány další produkty, které měly menší molekulovou hmotnost a může se tedy jednat o subgenomickou RNA nebo satelitní RNA. Vznik těchto produktů je důležitý při rozlišení jednotlivých virů v rámci rodů a čeledí. Bylo také zjištěno, že v rostlinných buňkách je přítomna i dsRNA, která nemusí být virového původu, a pouze ve srovnání se zdravou rostlinou můžeme po separaci v gelu odečíst přítomnost virové dvouvláknové RNA. Dvouvláknová RNA se od té doby používá jako výchozí materiál pro studium RNA virů.

4.2.1 Distribuce a výskyt dsRNA v rostlinných buňkách a pletivech

Jak už bylo popsáno, dsRNA se vyskytuje v rostlině při napadení dsRNA viry (+)ssRNA viry, dsRNA viry i (-)ssRNA viry. Virová dsRNA se v nakažené rostlině vyskytuje ve všech jejích

částech, ale v závislosti na stáří testované rostliny i na druhu použitého pletiva při testování se dsRNA v rostlině nachází v různých koncentracích. Bylo zjištěno, že větší množství dsRNA se nachází v listech, zatímco v kořenech a kůře je jí mnohem méně (Jordan *et al.*, 1983). Také byla potvrzena hypotéza, že v mladých listech se nachází více dsRNA než ve starých. Li *et al.* (2007) amplifikovali izolovanou dsRNA z různě starých listů jahodníku pomocí RT-PCR. Výsledek poukazyval na to, že dsRNA izolovaná z mladých listů vytvořila více produktu než dsRNA z listů starých. Zajímavé také bylo, že po zředění vzorků 1x byly všechny amplikony na gelu stejně zřetelné. Jenomže když bylo provedeno ředění 100x, amplikony dsRNA odpovídající vzorkům ze zralých listů už nebyly na gelu tak viditelné a po ředění 100 000x již skoro neviditelné oproti amplikonům dsRNA, která odpovídala listům mladým.

Moreno *et al.* (1989) sledovali změny v profilech dsRNA v průběhu roku. Po sesbírání materiálu v různých měsících v rámci jednoho roku byla provedena analýza dsRNA. Profily dsRNA byly velmi silné a jasné na jaře a na podzim, zatímco v létě polovina z nich se projevovala slabě a v zimě velmi slabě.

U mnoha onemocnění způsobené rostlinnými viry byly pozorovány i cytologické změny v buňkách hostitele. Mezi nejčastější patří vznik měchýřků na povrchu chloroplastů, mitochondrií, jádra nebo tonoplastu. Uvnitř těchto měchýřků jsou pozorovány struktury fibrilární povahy, které nejspíš odpovídají dvouvláknové RNA (Dodds *et al.*, 1984).

4.3 Metody studia virové dsRNA

4.3.1 Izolace dsRNA

Počátečním krokem ve studiu dvouvláknové RNA je její izolace. dsRNA lze izolovat z čerstvých, lyofilizovaných i zmražených rostlinných pletiv. Izolace probíhá poměrně snadno, protože dsRNA je stabilní a snadno se extrahuje i z malého množství rostlinného materiálu – 1 g i méně (Dodds *et al.*, 1984). K izolaci bývá tradičně používána fenol-chloroformová extrakce, ale známe i izolaci bez použití těchto látek.

Prvním, kdo se pokusil o izolaci dsRNA z viry infikovaných rostlin byli Morris *et al.* (1979). Tato metoda je využívána dodnes, i když byla řadou autorů modifikována. Nyní bude zjednodušeně popsán postup této izolace.

Izolace je zahájena homogenizací rostlinného pletiva o hmotnosti 10 g a přidáním 10 ml GPS pufru (0,2 mol/l glycin; 0,1 mol/l Na₂HPO₄; 0,6 mol/l NaCl; pH 9,5),

1 ml 10 % dodecylsírany sodného (SDS), 0,1 ml β -merkaptoetanolu, 10 ml fenolu a 10 ml roztoku chloroformu a pentanolu v poměru 25:1. Dále po stočení vzorku je využita vodná fáze, která obsahuje dvouvláknovou RNA, ale i jednovláknovou RNA a DNA. Zásadní v tomto postupu izolace dsRNA je použití celulózy CF-11 a etanolu, jehož absolutní koncentrace je 15 %. Dvouvláknová RNA se prioritně váže k celulóze CF-11 v přítomnosti etanolu právě o koncentraci 15%. Autoři pak v postupu pokračují na základě dvou různých postupů. První postup využívá celulózové kolony a druhá je tzv. „batch“ metoda.

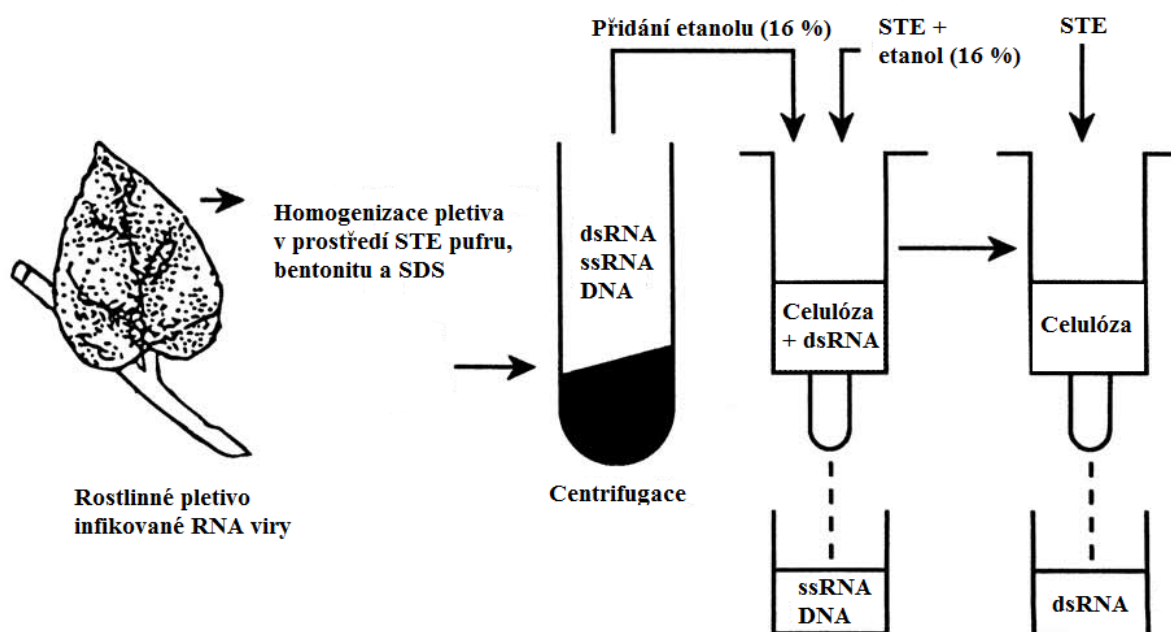
Dle prvního postupu je k vodné fázi přidán STE pufr (0,1 mol/l NaCl; 0,05 mol/l Tris-HCl; 0,001 mol/l Na₂EDTA; pH 7,0) s etanolem o celkové koncentraci 15 % (STE/15%Et). Tento roztok je umístěn na kolonu s celulózu CF11, opět promyt STE/15%Et. Dvouvláknová RNA je eluována STE pufrem bez přídavku etanolu.

U tzv. „batch“ metody je nejdříve propláchnuta celulóza CF11 15% vodným roztokem etanolu. Dobře promíchaná směs je centrifugována a supernatant odstraněn. Pelet je resuspendován v STE/15%Et a celulóza je umístěna na kolonu a promyta STE/15%Et k odstranění jednovláknové RNA. dsRNA je poté obdobně jako v prvním postupu uvolněna STE pufrem bez etanolu.

DNA ve vzorku pak může být odstraněna přídavkem deoxyribonukleázy I v prostředí hořčičných iontů. V posledním kroku dojde k vysrážení dsRNA etanolem. Ve zkratce se jedná o fenol-chloroformovou metodu izolace a schopnost různých druhů nukleových kyselin vázat se na celulózu CF11 v různé koncentraci etanolu. Ve vhodně zvolených podmínkách je tak možné, aby se dsRNA vázala výhradně na celulózu CF11.

Dalšími autory, kteří se zabývali vývojem metody izolace dsRNA byli Valverde *et al.* (1990). I když Valverde *et al.* (1990) vycházeli z výše popsaného postupu podle Morris *et Dodds* (1979), došlo k určitým změnám a celkovému zjednodušení. Zatímco Morris *et Dodds* (1979) izolovali z 10 g; Valverde *et al.* (1990) pouze z 3,5 g. K homogenátu je navíc přidáván bentonit, který sráží proteiny. U tohoto postupu je využito dvou kolon, na které jsou postupně nalaty suspenze celulózy CF11 a vodné fáze s etanolem. Zde nalézáme další rozdíl a to v koncentraci etanolu. Ta je v tomto případě 16 %. Obecné schéma můžeme vidět na obrázku 1. V principu je tato metoda velmi podobná a postup dle Valverde *et al.* (1990) a Morris *et Dodds* (1979) patří v dnešní době mezi nejpoužívanější.

Obrázek 1: Schéma postupu izolace dsRNA (převzato a upraveno z Valverde *et al.*, 1990)



Nicméně byly publikovány i alternativní metody izolace a purifikace dsRNA. Izolace dsRNA bez použití fenolu a chloroformu byla publikována v roce 2008 a vychází z postupu podle Morris *et Dodds* (1979). Rozdílem je použití jiného pufru, který se přidává k homogenizovanému vzorku. Nazývá se EBA pufr a obsahuje 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,5; 50 mmol/l EDTA; 3% SDS; 1% β -merkaptoetanol a 1% PVPP – polyvinylpolypyrrolidon. Dalším rozdílem je také vyšší celková koncentrace použitého etanolu, která je 20 % (Balijja *et al.*, 2008).

Ke zkvalitnění výsledku izolace dsRNA může být také použit enzym proteináza K. Proteináza K je využívána k rozštěpení proteinů a tím je schopna deaktivovat ribonukleázy a deoxyribonukleázy, které štěpí nukleové kyseliny (Akin *et al.*, 1998).

Kobayashi *et al.* (2009) představili inovativní metodu izolace dsRNA, která postrádá nevýhody klasických metod izolace dsRNA jako je časová náročnost. Autoři použili k izolaci protein, který vzniká fúzí glutation-S-transferázy (GST) a dsRNA „binding“ proteinu 4 (DRB4). GST-DRB4 protein specificky váže pouze dsRNA (Hiraguri *et al.*, 2005). Tato metoda se zdá být efektivní, došlo ke zkrácení doby izolace a s využitím dalších technik (reverzní transkripce, PCR amplifikace, klonování a sekvenování) byl pomocí této metody charakterizován genom viru *Gentian ovary ringspot virus* (Atsumi *et al.*, 2015).

Na závěr je nutno zmínit, že kvalita izolované dsRNA odpovídá přesnosti a čistotě práce. Všechny RNA molekuly jsou snadno degradovatelné ribonukleázami, které jsou aktivní

při různých teplotách i hodnotách pH. I přesto, že dsRNA je stabilnější než ssRNA je nutné postupovat při práci s dsRNA tak, aby byla před vlivem těchto enzymů ochráněna.

4.3.2 Detekce a identifikace rostlinných virů pomocí dsRNA profilů

Jak už bylo výše popsáno, izolovaná dsRNA z viry infikovaných rostlin vytváří po separaci v gelu dsRNA profil, podle kterého můžeme virus taxonomicky zařadit do dané skupiny. V minulosti byly popsány dsRNA profily čeledí *Bromoviridae*, *Virgaviridae* (Jordan *et al.*, 1983), *Luteoviridae* (Gildow *et al.*, 1983), *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Potyviridae* (Valverde *et al.*, 1985), *Closteroviridae* (Moreno *et al.*, 1989) a dalších. Jedná se o jednoduchou a časově nenáročnou metodu. Oproti jiným technikám je analýza dsRNA profilů výhodná i v případě, kdy je rostlina infikovaná několika viry zároveň (Valverde *et De La Torre-Almaraz*, 2017). Nevýhodou je, že dsRNA profily nejsou charakterizovány u všech rostlinných RNA virů a řada virů produkuje velmi malé množství dvouvláknových replikačních forem nebo subgenomické RNA, které po separaci nelze identifikovat (Valverde *et Dodds*, 1986).

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) a molekulární klonování

Izolovaná dsRNA nemůže sloužit jako templát pro amplifikaci pomocí PCR, proto musí být dsRNA přepsána do komplementární dvouvláknové molekuly DNA (cDNA) v procesu reverzní transkripce (RT). Poté následuje amplifikace cDNA pomocí PCR. Použitím specificky navržených primerů je RT-PCR jednou ze základních molekulárních metod detekce RNA virů.

V prvním kroku RT-PCR dochází k reverzní transkripci. Aby mohlo dojít k RT, musí proběhnout denaturace dsRNA. Při použití dsRNA jako templátu pro RT se potýkáme s problémem stability dsRNA. Naproti tomu u izolace dsRNA je její stabilita výhodou, zde je důležité, aby při RT došlo k úplnému rozvolnění molekuly a přepis proběhl bez chyby. K denuraci se používá působení vysoké teploty 99 °C po dobu 10 min, methylrtuť, dimethylsulfoxid nebo jejich kombinace (Hadidi *et al.*, 2011; Imai *et al.*, 1983; Jelkman *et al.*, 1989).

Po denuraci následuje samotná RT. Denaturovaná dsRNA je templátem k syntéze prvního vlákna cDNA enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza). Součástí reakční směsi RT musí být vhodně zvolené primery. V případě, že je studovaná

neznámá virová dsRNA, jsou velmi často používány náhodné hexanukleotidové primery, které nasedají podél celého úseku denaturované RNA. Pokud je sekvence známá, používají se specificky navržené primery. Při syntéze prvního vlákna cDNA vznikají duplexy RNA/DNA. Dále dochází k deaktivaci reverzní transkriptázy a do reakce je přidána ribonukleáza H, která degraduje templátová RNA vlákna a může proběhnout syntéza druhého vlákna cDNA enzymem DNA polymerázou I. Po RT probíhá standardní PCR (Cashdollar *et al.*, 1982; Tzanetakis *et al.*, 2005).

Izolace dsRNA a následná RT-PCR byla využita pro získání celogenomických sekvencí virů ovocných stromů jako jsou *Cherry virus A* (Jelkmann, 1995), *Cherry green ring mottle virus* (Zhang *et al.*, 1998) a *Prunus virus T* (Marais *et al.*, 2014); viry obilovin, mezi které patří např. *Barley yellow dwarf virus* (Gildow *et al.*, 1983) a viry dalších užitkových plodin jako například *Pea streak virus* (Su *et al.*, 2015).

Pokud je charakterizován genom neznámého viru a je k dispozici jen velmi malé množství vzorku, využívá se metoda DOP-PCR. Principem DOP-PCR je amplifikace cDNA s použitím degenerovaných oligonukleotidových primerů (DOP). DOP obsahují náhodnou hexanukleotidovou sekvenci mezi definovaným 5' a 3' koncem. Metodu DOP-PCR použili Rott *et al.* (2001) ke studiu vláknitých virů třešní. I přesto, že izolovali velmi malé množství dsRNA z viry infikovaných pletiv třešní, pomocí DOP-PCR a sekvenování popsali genom (+)ssRNA viru třešní *Cherry necrotic rusty mottle virus* patřícího do řádu *Tymovirales*, čeledi *Betaflexiviridae*.

Virová dsRNA přeepsaná do cDNA může sloužit jako templát pro molekulární klonování. Zhang *et al.* (2000) sekvenovali vybrané cDNA klony a popsali segmenty genomu virů napadající révu vinnou. Pomocí postupu, který představili Jelkmann *et al.* (1989) lze klonovat cDNA získanou z méně než 1 µg izolované dsRNA. Úspěšně klonovali cDNA odpovídající virům *Plum pox virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Strawberry mild yellow-edge virus* a *Raspberry leaf spot virus*.

4.3.4 Sekvenování genomu RNA virů

K sekvenování virové dsRNA, respektive cDNA, se používají klasické metody sekvenování i sekvenování nové generace (NGS, next generation sequencing).

Mezi klasické metody sekvenování řadíme Maxam-Gilbertovu metodu, která využívá značení fragmentů cDNA radioaktivním fosforem ³²P. Pomocí této metody byly popsány např. části genomu dsRNA virů infikujících rýži setou *Rice dwarf virus*, *Rice gall dwarf virus*

(Kudo *et al.*, 1991) a další. V současnosti se tato metoda již nepoužívá. Druhou klasickou metodou, která se naopak používá dodnes, je sekvenování podle Sangera. Studium izolované dsRNA a sekvenováním podle Sangera byly charakterizovány genomy (+)ssRNA virů např. *Little cherry virus 1* (Jelkmann *et al.*, 1997), *Blackberry yellow vein associated virus*, *Mint virus X*, *Beet pseudo-yellows virus*, (-)ssRNA virů – *European mountain ash ringspot-associated virus* (Benthack *et al.*, 2005) i dsRNA virů – *White clover cryptic virus 1* (Boccardo *et al.*, 2005a; Boccardo *et al.*, 2005b).

Sekvenování nové generace je soubor revolučních metod, které umožňují velmi rychlé sekvenování velkého množství DNA molekul. Tyto metody se vyvíjejí od počátku 21. století. Na začátku vývoje NGS stála technologie pyrosekvenování (platforma 454 firmy Roche). V současnosti je nejpoužívanější NGS technologií platforma firmy Illumina. Tato platforma stejně jako další (Solid, Pacific Biosciences a Ion Torrent) využívá postup, který zahrnuje přípravu cDNA knihovny, samotné sekvenování a analýzu dat. Výhodou je, že pomocí uvedených platform lze sekvenovat i cDNA získanou přepisem virové dsRNA a NGS se tak stává standardem v celogenomickém sekvenování rostlinných virů (Barba *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2015).

Pomocí platformy 454/Roche byly identifikovány viry 11 čeledí (*Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Chrysoviridae*, *Closteroviridae*, *Endornaviridae*, *Luteoviridae*, *Narnaviridae*, *Partitiviridae*, *Potyviridae*, *Totiviridae* a *Tymoviridae*), jejichž dsRNA byla izolovaná z planě rostoucích rostlinných druhů (Roosinck *et al.*, 2010). Coetzee *et al.* (2010) studovali viry révy vinné a použitím platformy Illumina detekovali druhy *Grapevine leafroll-associated virus 3*, *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* a *Grapevine virus A*.

Yanagisawa *et al.* (2016) použili izolovanou dsRNA pro NGS k identifikaci nového RNA viru pomocí DECS analýzy. DECS analýza zahrnuje izolaci dsRNA, exhaustivní RT-PCR amplifikaci, klonování a sekvenování. Izolaci dsRNA provedli pomocí rekombinantního proteinu DBR4, následovala standardní RT-PCR a molekulární klonování. Pro NGS byla použita platforma Ion Torrent. Výsledkem byla molekulární charakteristika genomu nového viru nazvaného *Blueberry shoestring virus* patřícího mezi (+)ssRNA viry, do rodu *Sobemovirus*.

4.4 Charakteristika rodu *Luteovirus*

Rod *Luteovirus*, společně s rody *Enamovirus* a *Polerovirus*, patří do čeledi *Luteoviridae*. Jde o viry, jejichž genom je tvořen (+)ssRNA a má velikost od 4,9 kb do 6,0 kb. Jsou pro ně charakteristické neobalené ikosaedrální částice o velikosti 25 – 30 nm (Anonymous 6).

Nejčastěji je přenos zástupců rodu *Luteovirus* uskutečněn pomocí hmyzího vektoru, konkrétně pomocí mšic. Přenos je vektorově specifický a konkrétní druh viru je přenášen pouze omezeným počtem druhů mšic (Gray *et* Gildow, 2003).

Do rodu *Luteovirus* podle ICTV 2015 patří 8 druhů: *Barley yellow dwarf virus-kerII*, *Barley yellow dwarf virus-kerIII*, *Barley yellow dwarf virus-MAV*, *Barley yellow dwarf virus-PAS*, *Barley yellow dwarf virus-PAV*, *Bean leafroll virus* a *Rose spring dwarf-associated virus*. Typovým druhem rodu *Luteovirus* je *Barley yellow dwarf virus-PAV*. *Barley yellow dwarf virus* způsobuje žlutou zakrslost ječmene. Příznaky této choroby závisí na druhu napadené rostliny, na jejím stáří apod., ale typicky se projevuje žloutnutím, případně červenáním listů. BYDV napadají hospodářsky významné rostliny čeledi *Poaceae* jako například oves setý, pšenice setá, ječmen setý, rýže setá a další (Miller *et* Rasochová, 1997). *Bean leafroll virus* způsobuje onemocnění nejčastěji u rostlin z čeledi bobovitých (Trucco *et al.*, 2016). Okruhem hostitelů většiny těchto virů jsou obiloviny nebo byliny.

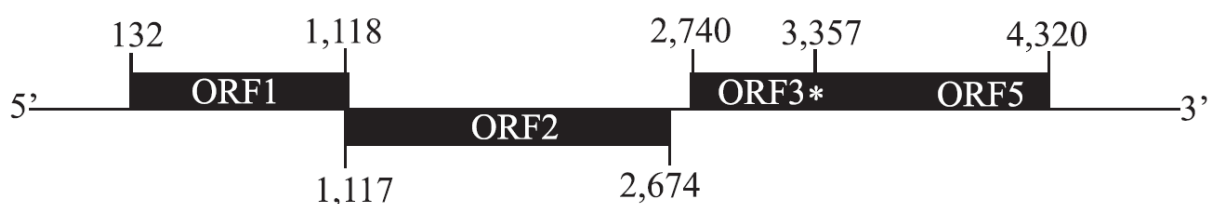
Do čeledi *Luteoviridae* patří 4 druhy, které přirozeně infikují dřeviny. Jedná se o *Citrus vein enation virus* z rodu *Enamovirus* infikující citrusy (Vives *et al.*, 2013). Další tři druhy patří do rodu *Luteovirus*. Jde o druhy *Nectarine stem pitting-associated virus*, *Cherry-associated luteovirus* a *Rose spring dwarf-associated virus*.

4.4.1 Molekulární charakteristika *Nectarine stem pitting-associated virus*

V roce 2015 byl charakterizován nový virus označený jako *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV), který byl izolován z pletiv broskvoně obecné (*Prunus persica*) (Bag *et al.*, 2015). Genom NSPaV je složen ze 4991 nukleotidů (nt) a zahrnuje 4 otevřené čtecí rámce (ORFs) označené jako ORF 1, ORF 2, ORF 3 a ORF 5 (viz obrázek 2). ORF 1 (132 – 1118 nt) a ORF 2 (1117 – 2674 nt) kódují proteiny P1 a P2, které tvoří RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp) účastnící se replikace. Při čtení ORF 2 dochází k posunu čtení tohoto čtecího rámce o jeden nukleotid ve směru k 5' konci (-1 posun), jak napovídá pozice posledního nukleotidu u ORF 1 – pozice 1118 a začátek ORF 2 – pozice 1117. V oblasti mezi ORF 1 a ORF 2 se vyskytuje sekvence konzervativní i pro ostatní viry

rodu *Luteovirus*, která je zodpovědná za tento posun ribozomu při translaci (Domier *et al.*, 2002). Jedná se o sekvenci „GGGUUUUU“. Mezi ORF 2 a ORF 3 se nachází mezigenová oblast o délce 65 nt. ORF 3 kóduje plášťový protein. Čtením ORF 3 a ORF 5 (2740 – 4325 nt) vzniká fúzní protein, jehož vznik je umožněn přeskočením „leaky“ stop kodonu v pozici 3357. Funkce tohoto proteinu je spojena s vektorovým přenosem viru pomocí mšic.

Obrázek 2: Organizace genomu NSPaV (převzato z Bag *et al.*, 2015)



* znázorňuje „leaky“ stop kodon na konci ORF 3

4.4.2 Molekulární charakteristika *Cherry-associated luteovirus*

Kolektiv vědců z Ústavu molekulární biologie rostlin v Českých Budějovicích publikoval v říjnu roku 2016 objev dalšího viru patřícího do řádu *Luteovirus* označeného jako *Cherry-associated luteovirus* (ChALV), který se vyskytuje na třešních (Lenz *et al.*, 2016). Genom ChALV se skládá z 5857 nukleotidů (nt). Součástí genomu je 8 otevřených čtecích rámců (ORF 1, ORF 2, ORF 3a, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6, ORF 7). Fúzí proteinů vznikajících čtením ORF 1 a ORF 2 (122 - 2793 nt) vzniká RdRp. Součástí ORF 1 je sekvence „GGGUUUUU“, která zodpovídá za posun ve čtení čtecího rámce. ORF 3a (2807 – 2944 nt) kóduje plášťový protein a ORF 4 kóduje „movement“ protein zodpovídající za pohyb viru z buňky do buňky. Součástí ORF 3a je UGA „leaky“ stop kodon. ORF 3 a ORF 5 (2948 - 4891 nt) kódují P3-P5 protein. V oblasti mezi ORF 5 a ORF 6 byla identifikována konzervativní sekvence typická pro zástupce rodu *Luteovirus* dlouhá 17 nukleotidů GGAUCCUGGGAAACAGG, která vytváří vlásenkovou strukturu. ORF 6 a ORF 7 zřejmě kódují zatím blíže neidentifikované proteiny.

4.4.3 Molekulární charakteristika *Rose spring dwarf-associated virus*

Genom *Rose spring dwarf-associated virus* je složen z 5808 nukleotidů a obsahuje 8 otevřených čtecích rámců. Obdobně jako u NSPaV a ChaLV čtením ORF 1 (187 – 1308 nt) a ORF 2 (1308 – 2888 nt) vzniká fúzní protein RdRp. ORF 3 (3006 – 3665 nt) a ORF 5 (3006 – 5045 nt) kóduje fúzní plášťový protein, jehož vznik je umožněn přeskočením „leaky“

stop kodonu mezi ORF 3 a ORF 5. ORF 4 (3055-3612 nt) je součástí ORF 3 a kóduje „movement“ protein. ORF 6, ORF 7 a ORF 8 kódují proteiny označované jako P6, respektive P7 a P8, jejichž funkce je zatím neznámá (Nida'M *et al.*, 2008).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Biologický materiál

V experimentální části byl použit vzorek s označením H83 z višně obecné (*Cerasus vulgaris*) – Amarelka chvalkovická (strom 2/15) pocházející z genofondu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. Byly použity listy, které vykazovaly mírnou difúzní mozaiku a jejich sběr byl proveden 29. 5. 2014. Listy byly lyofilizovány a uchovány při -70 °C.

5.2 Izolace dsRNA

Ve vychlazené třecí misce v kapalném dusíku bylo homogenizováno 750 mg listů. Homogenát byl přenesen do 15ml falkony a k němu bylo přidáno 4 ml STE 2x, 280 µl 20% SDS, 80 µl bentonitu a 5,7 ml fenolu. Falkona byla umístěna do rotátoru a promíchávána po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla falkona centrifugována 15 min při 3 000 g a 4 °C v chlazené centrifuze MR22i (Jouan). Vodná fáze byla odpipetována do mikrozkušavky o objemu 2 ml a znovu centrifugována 20 min při 10 000 g a 4 °C v chlazené centrifuze UNIVERSAL 320 R (Hettich). Vodná fáze byla odpipetovaná do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml. Byl přidán 99,8% etylalkohol tak, aby výsledná koncentrace etylalkoholu byla 15 % (celkový objem vodné fáze vynásobený 0,176). Mikrozkušavka byla vortexována a celý objem byl přenesen do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml s 40 mg celulózy CF11. Mikrozkušavka byla vortexována, promíchána na rotátoru po dobu 30 min a centrifugována 80 s při 5 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn. K peletu byl přidán 1 ml STE 1x + 15% etylalkohol. Mikrozkušavka byla vortexována, promíchána na rotátoru po dobu 5 min a centrifugována 80 s při 5 000 g při 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a promytí STE 1x + 15% etylalkohol bylo opakováno 3x – 5x do té doby, než se barva peletu stala bílou. Poté bylo k peletu přidáno 200 µl STE 1x. Mikrozkušavka byla vortexována, promíchána 5 min na rotátoru a centrifugována 80 s při 5 000 g a 4 °C. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml a uchováván na ledu. Pelet byl resuspendován v 200 µl STE 1x a krok byl opakován. Supernatant byl přidán k již dříve odpipetovanému a centrifugován 80 s při 5 000 g a 4 °C. Supernatant byl odpipetován do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 40 µl acetátu sodného a 320 µl izopropanolu. Srážení probíhalo přes noc při – 80 °C. Zkušavka byla centrifugována 20 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl propláchnut

0,5 ml 70% etanolu. Zkumavka byla centrifugována 20 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 170 µl dEPC vody. Vzorek byl ošetřen DNázou I podle návodu výrobce. Vzorek byl extrahován stejným objemem směsi fenol:chloform:isoamylalkohol. Zkumavka byla centrifugována 5 min při 10 000 g a 20 °C. Supernatant byl odstraněn a byl k němu přidán dvojnásobek objemu 99,8% etylalkoholu a jedna desetina objemu acetátu sodného, srážení RNA probíhalo 1 hod při -80 °C. Zkumavka byla centrifugována 20 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl omyt 0,5 ml 70% etylalkoholu. Zkumavka byla opět centrifugována 20 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozpuštěn v 50 µl dEPC vody. Koncentrace dsRNA a míra znečištění byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

5.3 RT-PCR

Detekce viru byla provedena pomocí RT-PCR amplifikace. Izolovaná dsRNA byla použita pro amplifikaci s primery En1F a En7R, které navrhl vedoucí práce na základě dat z NGS sekvenování získaných ve spolupráci s INRA Bordeaux (UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie). Jako negativní kontrola byla použita celková RNA izolovaná z listů meruňky (*Prunus armeniaca*) kultivar Marlen. RT-PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforetické separace. Detekci viru a elektroforetickou separaci provedl vedoucí práce.

Izolovaná dsRNA byla přepsána do cDNA v procesu reverzní transkripce (RT). Pro RT byla použita reverzní transkriptáza BioScript™ a random primery. Následovala PCR amplifikace cílených fragmentů pomocí primerů 3FLuteo/3RLuteo a 5FLuteo/5RLuteo. RT-PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforetické separace. Navržení primerů, RT-PCR a elektroforetická separace byla provedena pracovníky Laboratoře molekulární biologie a mikroorganismů.

5.4 Elektroforetická separace

PCR produkty byly detekovány elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu a vizualizovány pomocí UV-transluminátoru. Byl připraven 1% roztok agarózy v 1x TAE pufu. Do 50 ml tohoto roztoku po mírném zchladnutí byly přidány 3 µl barviva GoodView. Celý obsah byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel tuhnul 30 minut při pokojové teplotě a 15 minut v chladničce. Po ztuhnutí byl do elektroforetické komůrky nalit TAE 1x tak, aby převrstvil gel. Do první jamky byly napipetovány 2 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Do ostatních jamek bylo

napipetováno 5 μ l PCR produktů, které již obsahovaly vzorkovací pufr. Po uzavření elektroforetické komůrky probíhala separace 45 minut při 80 V.

5.5 Izolace PCR produktu z gelu

PCR produkty byly izolovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu dle postupu QIAquick Spin Handbook 07/2002, QIAGEN (Germany).

Nejprve byl připraven 1 % agarózový gel rozvařením 0,75 g agarózy v 75 ml TAE 1x. Po rozvaření bylo k roztoku přidáno 5 μ l 1% roztoku ethidium bromidu a celý objem byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Gel tuhnul 30 minut při pokojové teplotě a 15 minut v chladničce. Po ztuhnutí byl do elektroforetické komůrky nalit TAE 1x. Do první jamky byly napipetovány 2 μ l standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. Do ostatních jamek byly pipetovány PCR vzorky smíchané se 4 μ l nanášecího pufru Blue/Orange Loading Dye. Separace probíhala 45 minut při 80 V. Gel byl vyjmut a opláchnut destilovanou vodou a vizualizován při 365 nm na UV trasluminátoru.

Sterilním skalpelem byly vyřezány PCR produkty a umístěny do 1,5ml mikrozkušavek. Pro další postup bylo nutné zvážit každý z vyříznutých gelů. Do každé mikrozkušavky byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1 (v/w). Mikrozkušavky byly poté inkubovány při teplotě 50 °C v dry-bloku po dobu 10 minut, aby se gel v pufru rozpustil. Do mikrozkušavek byl přidán 1 objem izopropanolu (tzn. při navážce 100 μ g bylo přidáno 100 μ l izopropanolu). Směs byla napipetovaná do kolonek pro izolaci DNA, která byla vložena do sběrné zkumavky. Kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Bylo odstraněno to, co proteklo do sběrných zkumavek a na kolonky bylo přidáno 500 μ l QG pufru. Následovala centrifugace při stejných podmínkách jako první centrifugace a bylo vylito to, co proteklo. Na kolonky bylo přidáno 750 μ l PE pufru a opět centrifugace. Bylo vylito to, co proteklo a znova byly kolonky centrifugovány. Následně byly kolonky umístěny do nových 1,5ml zkumavek. Na střed kolonek bylo napipetováno 30 μ l destilované vody a kolonky byly centrifugovány při 13 000 rpm 10 min. Izolovanou DNA je pak možno dlouhodobě uchovávat při -20 °C.

5.6 Klonování PCR produktu

PCR produkty izolované z gelu byly zaklonovány do pGEM-T plazmidu a transformovány do bakterií *E. coli* (kmen DH5 α). Ke klonování byl použit kit pGEM[®]-T Easy Vector System. PCR produkty byly před ligací vysušeny v koncentrátoru a rozpuštěny v 6 μ l destilované

vody. Dále byla připravena ligační směs (viz tabulka I), která byla po promíchání inkubována přes noc při 4 °C. Rozmražené kompetentní buňky o objemu 50 µl byly smíchány s 5 µl ligační směsí a ponechány 20 min na ledu. Po teplotním šoku, kdy byly zkumavky inkubovány 45 s při 42 °C a ihned zchlazeny na ledu, bylo přidáno 850 µl SOC média. Směs byla inkubována na rotační třepačce po dobu 1,5 hod při teplotě 37 °C a poté centrifugována po dobu 2 min při 5 000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 50 µl SOC média. Byly připraveny kultivační misky s LB médiem s přidavkem ampicilinu. Na povrch média bylo napipetováno 4 µl IPTG a 40 µl X-Gal. Resuspendované buňky byly na povrch LB/Amp/IPTG/X-Gal média napipetovány a rozetřeny kultivační kličkou. Kultivační misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Pozitivní kolonie byly pomocí sterilních párátek přeneseny na nové LB/Amp médium a inkubovány přes noc při 37 °C. Pozitivní kolonie poté byly otestovány pomocí PCR s použitím primerů M13F/M13R. Podle počtu testů byla připravena PCR reakční směs (viz tabulka II) a rozpipetována do PCR zkumavek. Vzorky kolonií transformovaných bakterií byly přeneseny párátkem do PCR zkumavek. PCR amplifikace probíhala za podmínek uvedených v tabulce III. PCR produkty byly poté vyhodnoceny pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu (viz 4.4 Elektroforetická separace) s tím rozdílem, že do jamek bylo pipetováno 3 µl PCR produktu. Elektroforetická separace byla provedena pracovníky Laboratoře molekulární biologie a mikroorganismů.

V případě positivity byly PCR produkty opět izolovány z gelu (viz 4.5 Izolace PCR produktu z gelu) a byla u nich pomocí fluorimetru změřena koncentrace DNA.

Tabulka I: Složení ligační směsi

Chemikálie	Množství na 1 reakci [µl]
pGEM-T ligační pufr	5,0
ligáza	1,0
pGEM-T plazmid	0,5
PCR produkt	3,5

Tabulka II: Složení PCR reakční směsi

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μl]
pufr	5x	1x	5,00
voda	-	-	19,70
primer M13F	100 pmol/ μ l	0,2 μ mol/l	0,05
primer M13R	100 pmol/ μ l	0,2 μ mol/l	0,05
Taq DNA polymeráza	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,20

Tabulka III: Podmínky PCR amplifikace s použitím primerů M13F/M13R

Proces	Teplota [$^{\circ}$C]	Čas	Počet cyklů
inkubace	96	1 min	1
denaturace	96	10 s	40
hybridizace	50	5 s	
elongace	60	4 min	

5.7 Sekvenování

Izolované PCR produkty byly označeny pomocí Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu podle návodu. Nejprve musely být PCR produkty vhodně naředěny, aby měly odpovídající koncentraci DNA. Byly připraveny 2 reakční směsi, přičemž každá se lišila v použití jiného primeru (primer M13F a primer M13R). Směs pro 1 vzorek se skládala z 1 μ l Big Dye pufru, 1 μ l Big Dye a 2 μ l odpovídajícího primeru (1,6 pmol/ μ l). Po rozpipetování bylo do každé PCR mikrozkušavky přidáno 6 μ l naředěného PCR produktu. PCR zkumavky byly umístěny do termocykléru a sekvenační značení probíhalo za podmínek uvedených v tabulce IV. Vzorky byly sekvenovány pomocí genetického analyzátoru ABI3730 na pracovišti ÚEB, AV ČR, Olomouc. Výstupy získané z genetického analyzátoru byly sestaveny do kontigů v programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.). Identifikace viru byla provedena porovnáním se sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST.

Tabulka IV: Podmínky sekvenačního značení vzorků

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
uvolnění a denaturace plazmidu	95	5 min	1
PCR amplifikace	95	30 s	25
	55	30 s	
	72	30 s	
elongace	72	10 min	1

5.8 Bioinformatická analýza

Sekvence jednotlivých klonů byly přiřazeny pomocí mnohočetného alignmentu v programu ClustalW, který je součástí programu MEGA7. Analýza DNA polymorfismu sekvence byla provedena v programu DnaSP v5. Fylogenetické stromy byly vytvořeny metodou neighbor-joining a vizualizovány v modulu Tree Explorer v programu MEGA7. Rekombinační analýza byla provedena v programu RDP4 v4.85 s použitím algoritmů RDP, GENECONV, BOOTSCAN/RECSCAN, MAXCHI a CHIMAERA.

5.9 Použité chemikálie a roztoky

Acetát sodný (Lachner; 3 mol/l; pH 5,2)

Agaróza I™ Biotechnology Grade (Ambresco)

Ampicilin (100 µg/µl)

Bentonit (Sigma-Aldrich, 40 mg/ml)

Bromfenolová modř (1% roztok v 30% glycerínu)

CF11 celulóza (Whatman)

dEPC voda

DNáza I (Thermo Scientific)

Ethidium bromid (1% roztok ve vodě)

Etylalkohol 70 %

Etylalkohol 99,8 % pro UV spektroskopii (Lachner)

Fenol (Sigma-Aldrich)

Fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:25:1; Sigma-Aldrich)

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

GoodView™ Nucleic Acid Stain

IPTG (200 mg/ml)

Izopropanol (Lachner)

Kapalný dusík

LB médium

SDS (20%)

SOC médium pro pGEM®-T Easy Vector System

STE pufr 1x + 15% ethylalkohol (4 ml STE 10x + 6 ml etylalkoholu 99,8% pro UV spektroskopii + 30 ml dEPC vody)

STE pufr 2x (0,2 mol/l NaCl; 100 mmol/l Tris; 2 mmol/l EDTA)

TAE pufr 1x (40 mmol/l Tris-acetát, 2 mmol/l EDTA)

X-Gal (20 mg/1 ml)

5.10 Použité kity

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)

pGEM®-T Easy Vector System (Promega)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

5.11 Použité přístroje

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

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

DNA fluorometr Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas)

Fluorimetr Hoefer DyNa Quant 200 (Amersham Biosciensis)

G:BOX - gelový dokumentační a analytický systém (Syngene)

Chlazená centrifuga MR22i (Jouan)

Chlazená centrifuga UNIVERSAL 320 R (Hettich)

Koncentrátor SPD111V-230 (SpeedVac™)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Mikrovlnná trouba MA 85050 (OTF)

Minicentrifuga Spectrafuge™ MINI (Labnet)

NanoDrop 1000 Spektrofotometr (ThermoScientific)

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

Rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan)

Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)

Termocycler T100 (BIO-RAD)

Termocycler T-Personal (Biometra)

UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)

Vakuová pumpa XF5423050 (Millipore)

Vortex MS 2 (IKA)

Zdroj stejnosměrného proudu Power Station 300 (Labnet)

6 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bylo izolovat dsRNA a využít ji pro detekci a sekvenování genomu *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV).

Izolace dsRNA a detekce viru NSPaV ve vzorku H83

Z listů višně vzorku H83 byla izolována dsRNA a změřena její koncentrace pomocí spektrofotometru, která byla 4 ng/μl, poměr absorbancí 260/280 vyjadřující míru znečištění se rovnal hodnotě 1,54 a poměr absorbancí 260/230 hodnotě 3,3.

Přítomnost *Nectarine stem pitting-associated virus* ve vzorku H83 byla potvrzena pomocí RT-PCR. Amplifikace s primery En7F a En1R vedla ke vzniku PCR produktu o přibližné velikosti 350 bp (viz obrázek 3), sekvenováním naklonovaného produktu byla stanovena očekávaná velikost 338 bp. Negativní kontrola i slepý vzorek nedávaly žádný PCR produkt.

Obrázek 3: Detekce viru NSPaV pomocí RT-PCR s primery En7R a En1F



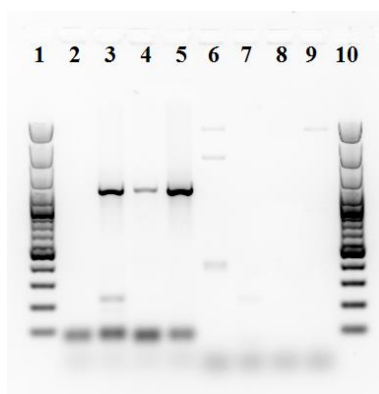
Legenda: 1: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 2: negativní kontrola, 3: slepý vzorek H₂O, 4-10: neznámé vzorky, 11: H83

PCR amplifikace s primery 3FLuteo/3RLuteo

Izolovaná dsRNA byla přepsána do cDNA a amplifikovaná pomocí primerů 3FLuteo/3RLuteo. PCR byla třikrát opakována a byly získány tři RT-PCR produkty o očekávané velikosti 1100 bp s označením 8L, 9L a 10L. Po izolaci z gelu byly zaklonovány do pGEM-T plazmidu a transformovány do bakterií *E. coli*. Dále byla provedena PCR s primery M13F/M13R. V případě klonovaného PCR produktu 8L bylo testováno 6 kolonií, 5 z nich dávalo očekávaný produkt o velikosti 1300 bp; v případě produktu 9L bylo testováno 6 kolonií, 5 z nich dávalo očekávaný produkt o velikosti 1300 bp; v případě 10L bylo

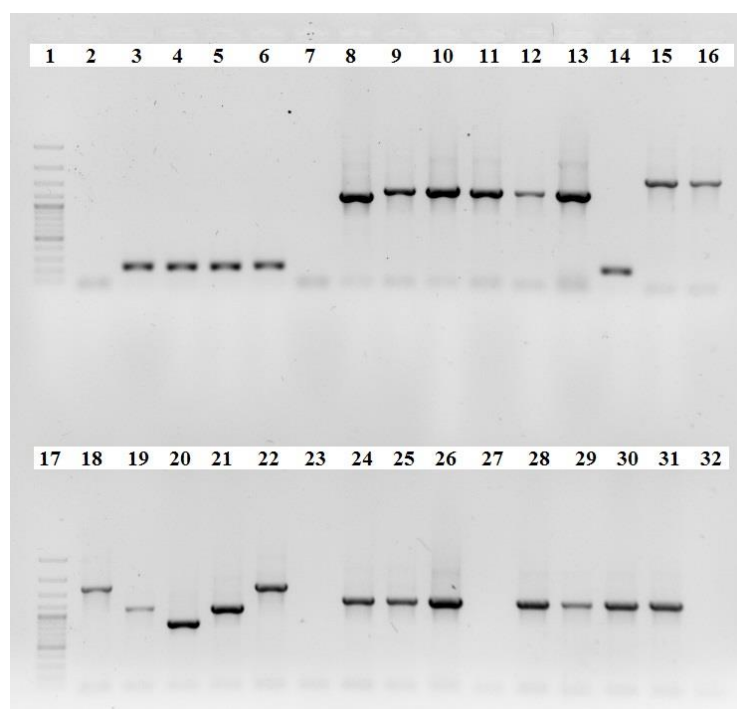
testováno 5 kolonií, všechny z nich dávaly očekávaný produkt o velikosti 1300 bp. PCR produkty z 2 kolonií 8L pojmenované 8L40 a 8L42 byly značeny a sekvenovány; PCR produkty z 3 kolonií 9L pojmenované 9L56, 9L58 a 9L59 byly značeny a sekvenovány; PCR produkty z 2 kolonií 10L pojmenované 10L63 a 10L65 byly značeny a sekvenovány (viz obrázek 5 a obrázek 6). Před značením a sekvenováním byla u PCR produktů změřena koncentrace DNA (viz tabulka V).

Obrázek 4: RT-PCR amplifikace genomického segmentu virového izolátu H83 s pomocí primerů 3FLuteo/3RLuteo



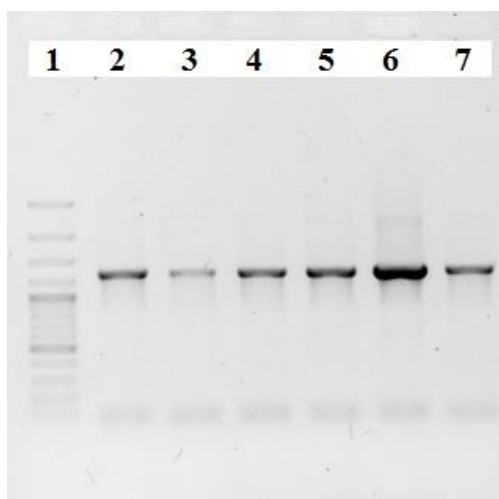
Legenda: 1,10: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder; 2, 6-9: neznámé vzorky; 3: 8L; 4: 9L; 5: 10L

Obrázek 5: PCR amplifikace s pomocí primerů M13F/M13R



Legenda: 1,17: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder; 2-8: neznámé vzorky; 9: 8L38; 10: 8L39; 11: 8L40; 12: 8L41; 13: 8L42; 14: 8L43; 15-27: neznámé vzorky; 28: 9L56; 29: 9L57; 30: 9L58; 31: 9L59; 32: 9L60. Tučně jsou vyznačeny PCR produkty, které byly značeny a sekvenovány.

Obrázek 6: PCR amplifikace s pomocí primerů M13R/M13F



Legenda: 1: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 2: 9L61, 3: 10L62, **4: 10L63**, 5: 10L64, **6: 10L65**, 7: 10L66. Tučně jsou vyznačeny PCR produkty, které byly značeny a sekvenovány.

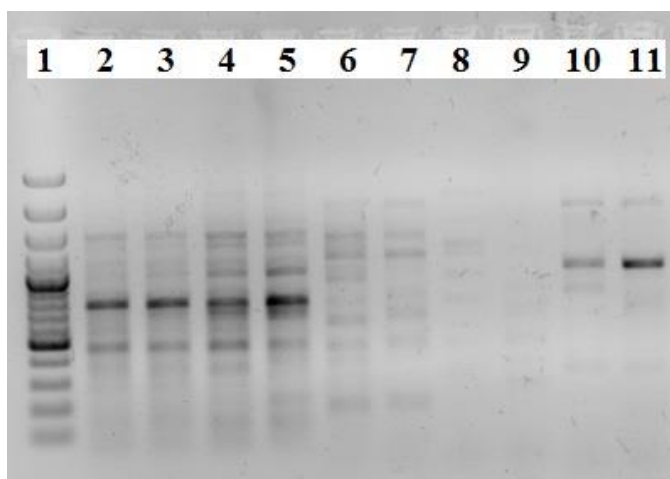
Tabulka V: Koncentrace DNA PCR produktů amplifikovaných s primery M13R/M13F

PCR produkt	8L40	8L42	9L56	9L58	9L59	10L63	10L65
Koncentrace [ng/μl]	35	41	37	33	36	26	47

PCR amplifikace s primery 5FLuteo/5RLuteo

Izolovaná dsRNA přepsána do cDNA byla amplifikovaná pomocí primerů 5FLuteo/5RLuteo. RT-PCR produkt s označením CR/CF o velikosti 1000 bp byl izolován z gelu a přímo značen a sekvenován.

Obrázek 7: RT-PCR amplifikace genomického segmentu virového izolátu H83 s pomocí primerů 5FLuteo/5RLuteo



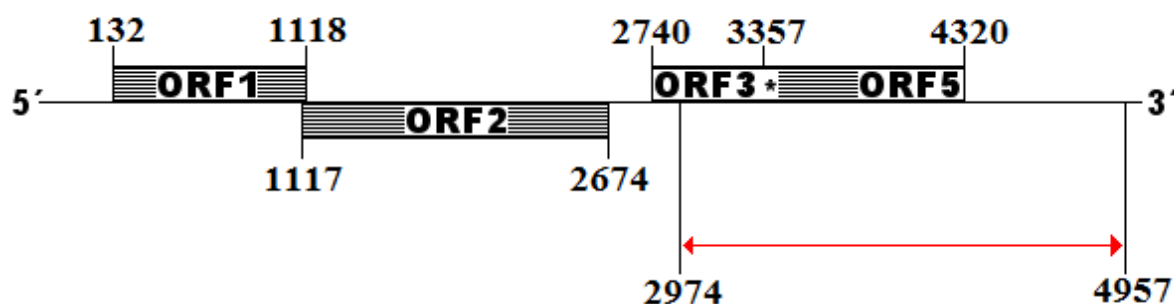
Legenda: 1: GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 2-10: neznámé vzorky, 11: CR/CF

Skládání sekvence a její porovnání s referenční sekvencí NSPaV

Primární sekvence 8L40 byla složena do kontigu o velikosti 1041 nt, 8L42 do kontigu o velikosti 1055 nt, 9L56 do kontigu o velikost 1055 nt, 9L58 do kontigu o velikosti 1055 nt, 9L59 do kontigu o velikosti 1061 nt, 10L63 do kontigu o velikosti 1055 nt, 10L65 do kontigu o velikosti 1061 nt a CR/CF do kontigu o velikost 928 nt. Jednotlivé kontigy byly porovnány se sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST a všechny vykazovaly identitu větší než 90 % s *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV) izolátem 12P42 (Accession number, Acc. No. KT273410.1), NSPaV izolátem SF04522E (Acc. No. KT273409.1) a s celogenomickou sekvencí NSPaV (Acc. No. NC_027211.1). Kontigy byly přiřazeny pomocí mnohočetného alignmentu a byla získána sekvence o velikosti 1984 nt.

Sekvence izolátu H83 o velikosti 1984 nt byla poté porovnána s celogenomickou referenční sekvencí NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) a určena její pozice. Sekvence odpovídá ORF 3, ORF 5 a 3' nepřekládané oblasti. Byla získána částečná sekvence ORF 3 o délce 384 nt z celkové délky 618 nt nacházející se v pozici 2974-3357 referenční sekvence a sekvence celého čtecího rámce ORF 5 o délce 964 nt v pozici 3357-4320. Také byla získána část sekvence 3' nepřekládané oblasti o délce 638 nt z celkové délky 672 nt v pozici 4320-4957. „Leaky“ stop kodon UGA byl identifikován v pozici 3357 (viz obrázek 8).

Obrázek 8: Organizace genomu NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) s vyznačenou sekvencí izolátu H83



Legenda: červená šipka vyznačuje úsek získané sekvence, * znázorňuje „leaky“ stop kodon v pozici 3357

Pomocí mnohočetného alignmentu byly identifikovány nukleotidové a aminokyselinové záměny mezi izolátem H83 a referenční sekvencí NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) oblasti ORF 3 a ORF 5. Mezi těmito sekvencemi se vyskytovalo 97 nukleotidových záměn a 37 aminokyselinových záměn (viz tabulka VI).

Tabulka VI: Výskyt a pozice nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) a získanou sekvencí izolátu H83 v oblasti ORF 3 a ORF 5

Pozice NT	NT záměna	Pozice AMK	AMK záměna
268	C/T	89	K/K
283	G/T	95	A/S
306	A/G	102	K/K
309	T/A	103	S/S
318	C/T	106	D/D
405	T/C	135	S/S
435	G/A	145	V/V
457	T/A	153	S/T
459	A/T	154	F/F
483	T/C	161	P/P
510	C/T	170	N/N
537	A/T	179	L/L
546	G/A	182	A/A
554	C/T	185	A/V
555	A/T	185	A/V
559	T/A	187	S/T
580	A/G	194	I/V
588	C/T	196	T/T
618	T/C	206	S/S
639	T/A	213	P/P
645	G/A	215	E/E
648	A/G	216	P/P
649	A/G	217	T/A
660	T/A	220	P/P
678	A/T	226	S/S
745	C/T	249	H/Y
750	A/C	251	K/K
804	A/C	268	K/N
837	C/T	279	D/D
852	T/G	284	F/L
855	A/G	285	P/P
862	C/T	288	L/L
864	G/A	288	L/L

Pozice NT	NT záměna	Pozice AMK	AMK záměna
897	C/T	299	Y/Y
906	T/C	302	C/C
912	G/A	304	G/G
948	C/A	316	N/K
952	C/A	318	H/N
1001	C/T	333	A/V
1023	G/A	341	K/K
1026	T/A	342	I/I
1035	T/C	345	Y/Y
1047	T/C	349	H/H
1089	T/C	363	C/C
1098	T/C	366	H/H
1103	A/G	368	D/G
1104	C/A	368	D/G
1107	G/A	369	Q/Q
1126	A/G	376	I/V
1179	A/T	393	P/P
1188	C/T	396	I/I
1191	A/G	397	Q/Q
1224	C/T	409	S/G
1225	A/G	409	S/G
1234	A/T	412	T/S
1236	T/A	412	T/S
1239	T/C	413	D/D
1242	A/G	414	K/K
1260	C/T	420	S/S
1272	T/G	424	S/S
1278	C/T	426	D/D
1282	G/A	428	V/N
1283	T/A	428	V/N
1299	T/C	433	C/C
1344	A/T	450	Y/F
1355	C/T	452	A/V

Pokračování Tabulky VI: Výskyt a pozice nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) a získanou sekvencí izolátu H83 v oblasti ORF 3 a ORF 5

Pozice NT	NT záměna	Pozice AMK	AMK záměna
1356	A/G	452	A/V
1373	G/T	458	G/V
1374	T/C	458	G/V
1375	T/C	459	S/P
1383	C/A	461	H/Q
1384	T/A	462	F/I
1415	A/T	472	E/V
1417	A/T	473	I/S
1418	T/C	473	D/E
1428	C/A	476	T/T
1434	C/A	478	P/P
1437	T/A	479	L/L
1440	A/G	480	S/A
1468	T/G	490	S/A
1470	A/G	490	A/E

Pozice NT	NT záměna	Pozice AMK	AMK záměna
1475	C/A	492	T/T
1482	T/C	494	P/S
1486	C/T	496	P/S
1495	C/T	499	P/S
1497	T/C	499	P/S
1498	C/T	500	P/S
1500	A/C	500	P/S
1506	C/T	502	P/P
1510	G/A	504	V/I
1525	C/A	509	P/T
1528	A/C	510	T/P
1557	T/A	519	N/K
1560	A/T	520	S/S
1570	T/A	524	F/I

Legenda: Nukleotidové (NT) a aminokyselinové (AMK) záměny jsou popsány tak, že nukleotid nebo aminokyselina před lomítkem přísluší NSPaV a nukleotid nebo aminokyselina za lomítkem přísluší izolátu H83. Pozice nukleotidů i aminokyselin je vztažena k začátku sekvence ORF 3 NSPaV (Acc. No. NC_027211.1). Zvýrazněny jsou nukleotidové záměny, které způsobily změnu aminokyseliny. Nukleotidové a aminokyselinové záměny před oddělovací tučnou čarou se vyskytují v ORF 3 a záměny za tlustou čarou se vyskytují v ORF 5.

Fylogenetická analýza

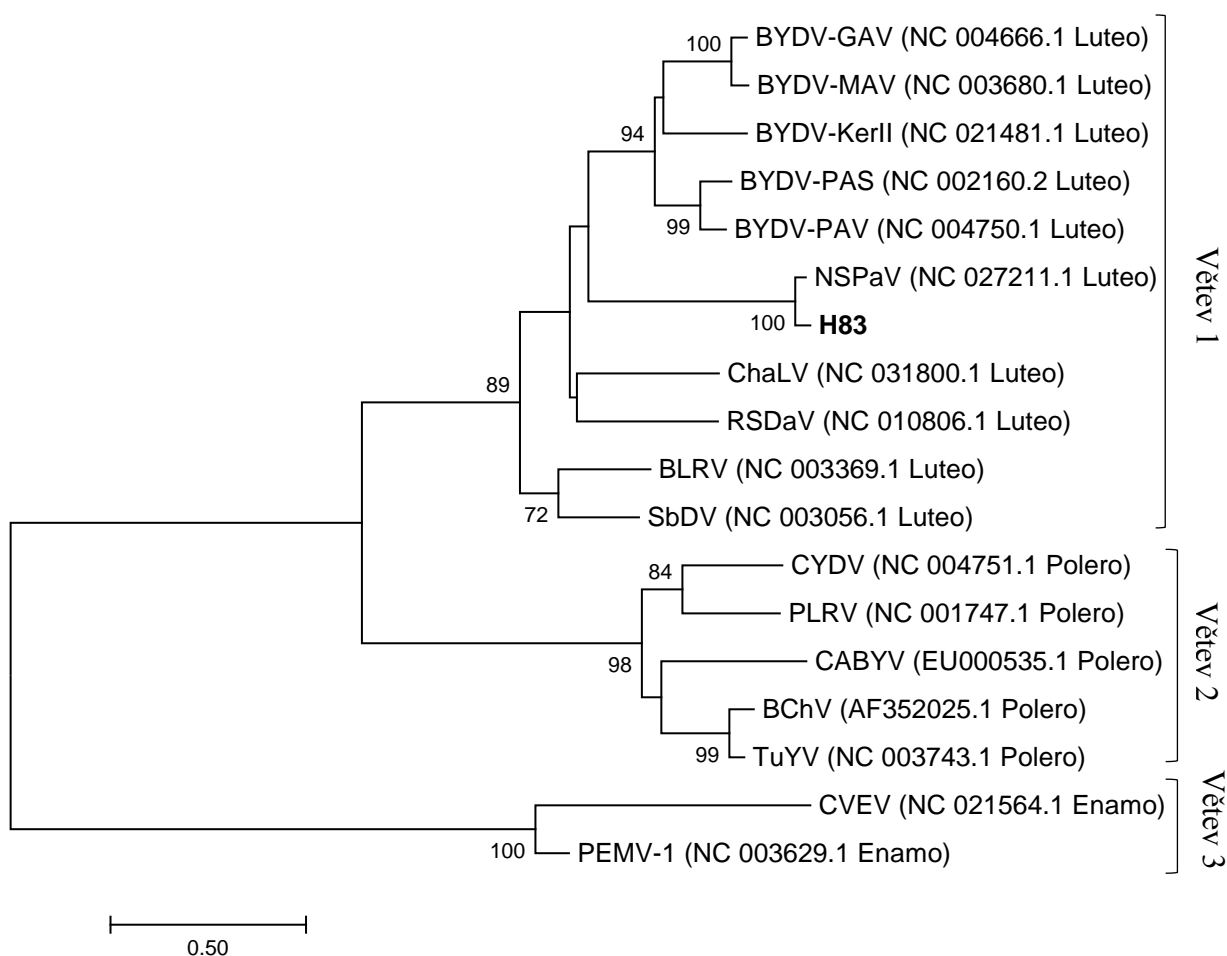
S cílem zjistit fylogenetickou pozici izolátu H83 v rámci rodu *Luteovirus* byly vytvořeny fylogenetické stromy na základě neighbor-joining analýzy.

Z fylogenetické analýzy parciální nukleotidové sekvence ORF 3 a ORF 5 (1347 nt) izolátu H83 vyplývá, že izolát H83 a NSPaV vytvořili společnou větev se zástupci *Barley yellow dwarf virus* (BYDV). Dalšími zástupci ve stejné větvi jsou *Cherry-associated luteovirus* (ChaLV) a *Rose spring dwarf-associated virus* (RSDaV). Dále se v této větvi nacházeli zástupci rodu *Luteovirus* - *Bean leafroll virus* (BLRV) a *Soybean dwarf virus* (SbDV). Druhá větev zahrnuje zástupce rodu *Polerovirus* a třetí větev vytvořili zástupci rodu *Enamovirus* (viz obrázek 10).

Dále byla provedena fylogenetická analýza aminokyselinové sekvence, která čítá 449 aminokyselin a odpovídá parciální sekvenci čtecího rámce ORF 3 a ORF 5 izolátu H83.

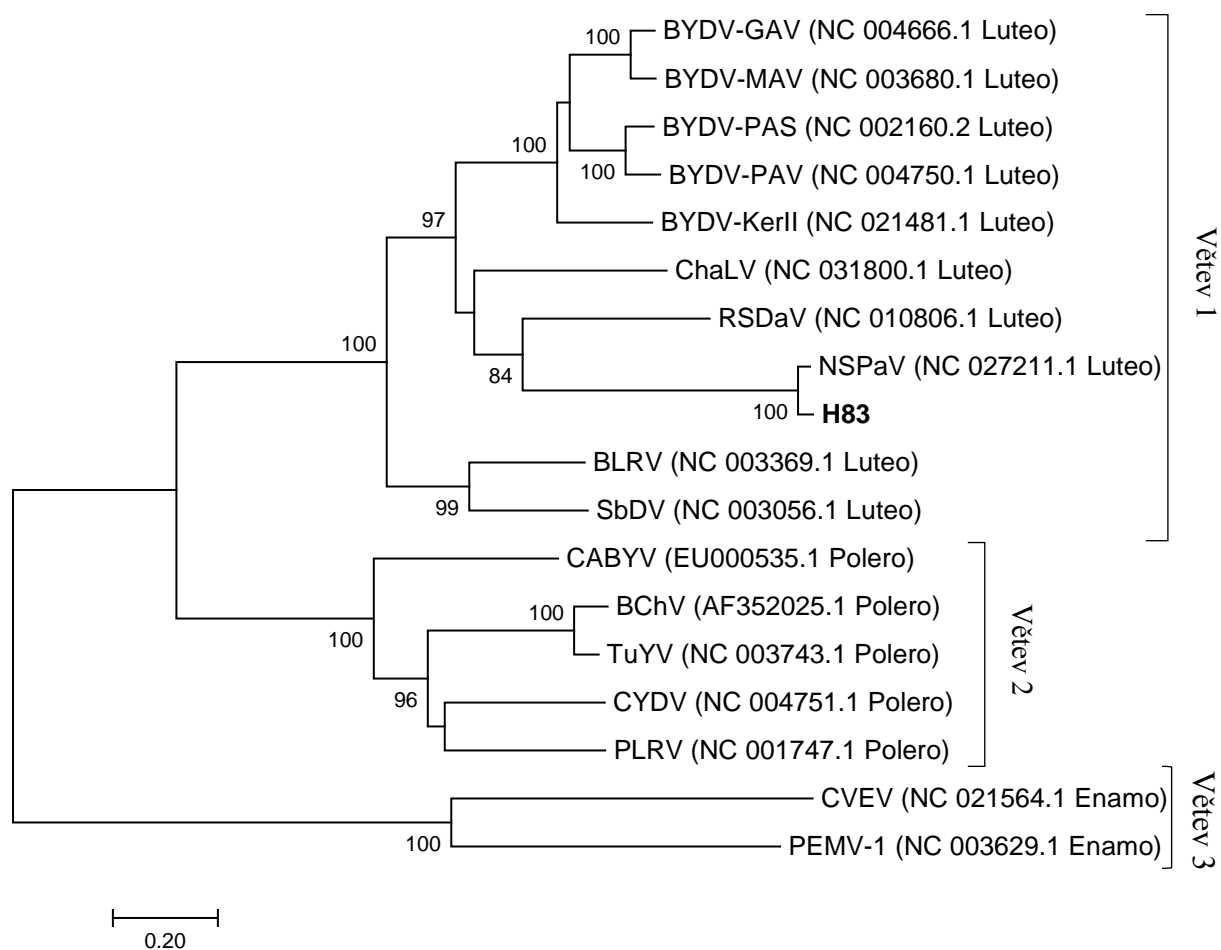
Narozdíl od fylogenetické analýzy nukleotidové sekvence jsou nejbližšími příbuznými NSPaV a izolátu H83 zástupci *Rose spring dwarf-associated virus* (RSDaV) a *Cherry-associated luteovirus* (ChaLV). Součástí stejné větve jsou další členové rodu *Luteovirus* - *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), *Bean leafroll virus* (BLRV) a *Soybean dwarf virus* (SbDV). Další větev tvoří zástupci rodu *Polerovirus*. Třetí větev zahrnuje zástupce rodu *Enamovirus* (viz obrázek 11).

Obrázek 10: Fylogenetický strom vybraných zástupců čeledi *Luteoviridae* vytvořený na základě neighbor-joining analýzy **nukleotidových** sekvencí odpovídajících parciální sekvenci ORF 3 a ORF 5 izolátu H83



Zástupci jsou popsáni zkratkou názvu, v závorce je uvedeno Acc. No. a zkratka rodu, do kterého patří. Měřítko představuje 0,50 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou hodnoty bootstrap ≥ 70 . Tučně je vyznačena získaná sekvence. Použité zkratky: BYDV-GAV - *Barley yellow dwarf virus-GAV*, BYDV-MAV - *Barley yellow dwarf virus-MAV*, BYDV-KerII - *Barley yellow dwarf virus-kerII*, BYDV-PAS - *Barley yellow dwarf virus-PAS*, BYDV-PAV - *Barley yellow dwarf virus-PAV*, ChaLV - *Cherry-associated luteovirus*, RSDaV - *Rose spring dwarf-associated virus*, BLRV - *Bean leafroll virus*, SbDV - *Soybean dwarf virus*, CYDV - *Cereal yellow dwarf virus-RPV*, PLRV - *Potato leafroll virus*, CABYV - *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, BChV - *Beet chlorosis virus*, TuYV - *Turnip yellows virus*, CVEV - *Citrus vein enation virus*, PEMV-1 - *Pea enation mosaic virus 1*, Luteo - *Luteovirus*, Polero - *Polerovirus*, Enamo - *Enamovirus*

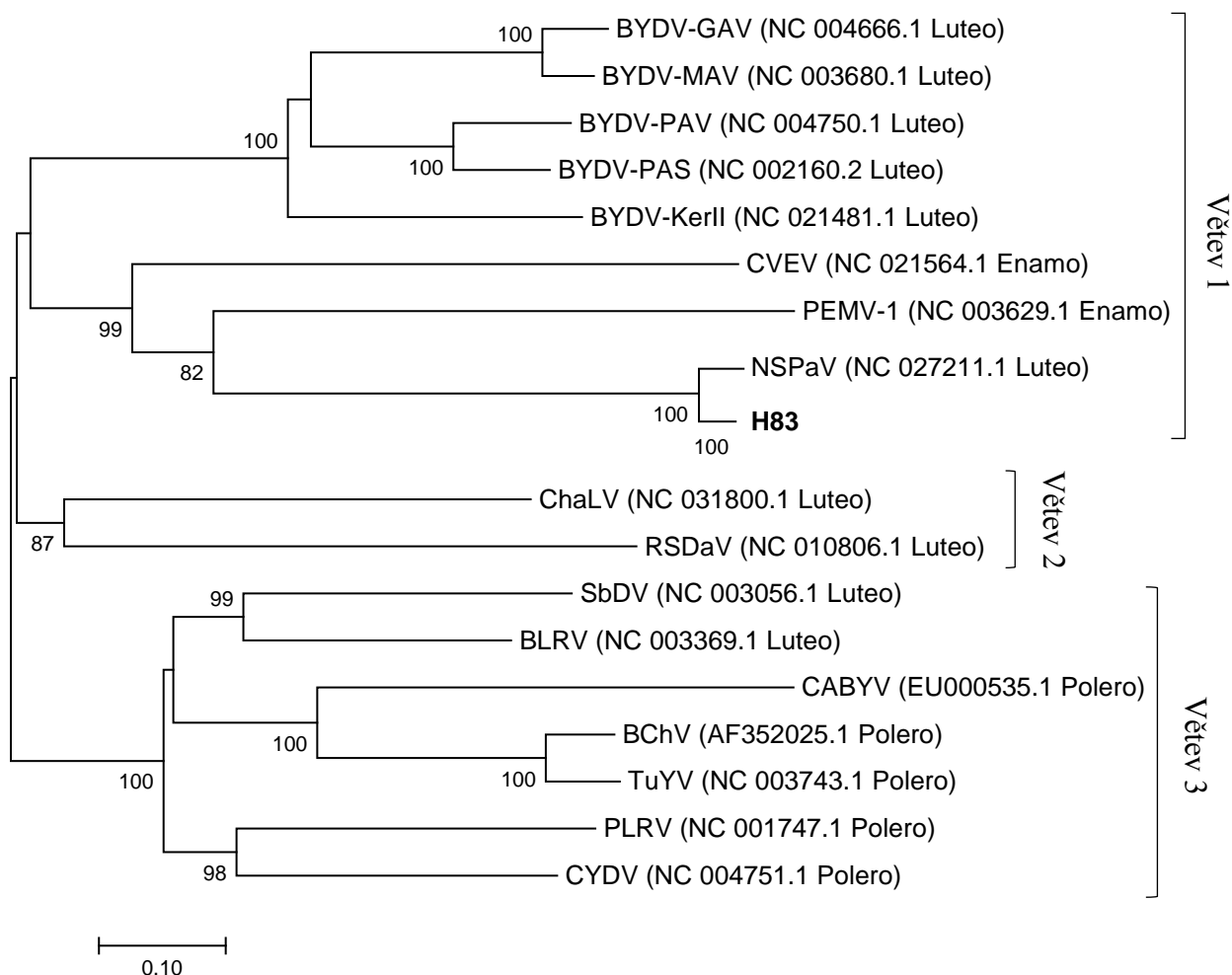
Obrázek 11: Fylogenetický strom vybraných zástupců čeledi *Luteoviridae* vytvořený na základě neighbor-joining analýzy **aminokyselinových** sekvencí odpovídajících parciální sekvenci ORF 3 a ORF 5 izolátu H83



Zástupci jsou popsáni zkratkou názvu, v závorce je uvedeno Acc. No. a zkratka rodu, do kterého patří. Měřítko představuje 0,20 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou hodnoty bootstrap ≥ 70 . Uvedení zástupci se shodují se zástupci, kteří jsou uvedeni ve fylogenetickém stromu (viz obrázek 10). Tučně je vyznačena získaná sekvence.

U fylogenetického stromu vytvořeného na základě parciální sekvence 3' nepřekládané oblasti (638 nt) izolátu H83 došlo k odlišnému větvení než u fylogenetického stromu vytvořeného na základě parciální sekvence ORF 3 a ORF 5. Součástí první větve jsou izolát H83, NSPaV, dva zástupci rodu *Enamovirus* - *Pea enation mosaic virus 1* (PEMV-1) a *Citrus vein enation virus* (CVEV) a zástupci *Barley yellow dwarf virus* (BYDV). Druhá větev zahrnuje *Rose spring dwarf-associated virus* (RSDaV) a *Cherry associated-luteovirus* (ChaLV) patřících do rodu *Luteovirus*. Třetí větev vytvořily viry rodu *Polerovirus* a dva členové rodu *Luteovirus* - *Soybean dwarf virus* (SbDV) a *Bean leafroll virus* (BLRV) (viz obrázek 12).

Obrázek 12: Fylogenetický strom vybraných zástupců čeledi *Luteoviridae* vytvořený na základě neighbor-joining analýzy parciální sekvence 3' nepřekládané oblasti izolátu H83

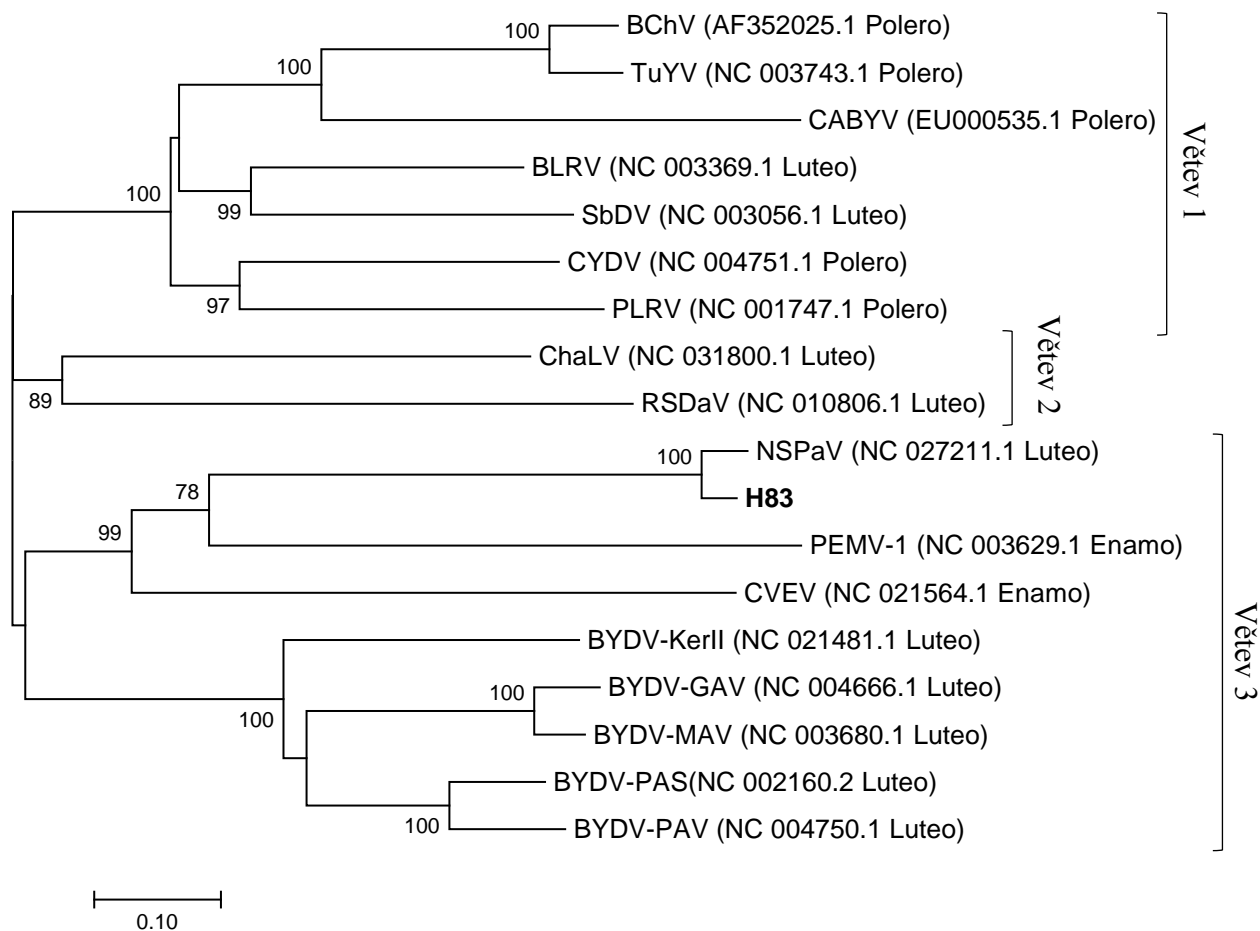


Zástupci jsou popsáni zkratkou názvu, v závorce je uvedeno Acc. No. a zkratka rodu, do kterého patří. Měřítko představuje 0,10 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou hodnoty bootstrap ≥ 70 . Uvedení zástupci se shodují se zástupci, kteří jsou uvedeni ve fylogenetickém stromu (viz obrázek 10). Tučně je vyznačena získaná sekvence.

Fylogenetická analýza celé získané nukleotidové sekvence izolátu H83, která se skládá z částečné sekvence ORF 3, ORF 5 a částečné sekvence 3' nepřekládané oblasti (1984 nt) ukazuje, že první větev zahrnuje izolát H83, NSPaV a zástupce rodu *Enamovirus* – *Pea enation mosaic virus 1* (PEMV-1) a *Citrus vein enation virus* (CVEV) obdobně jako u fylogenetického stromu vytvořeného na základě částečné sekvence 3' nepřekládané oblasti. Součástí této větve jsou také zástupci *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) z rodu *Luteovirus*. Druhou samostatnou větev vytvářejí *Rose spring dwarf-associated virus* (RSDaV) a *Cherry associated-luteovirus* (ChaLV). Třetí větev zahrnuje viry *Soybean dwarf virus* (SbDV),

Bean leafroll virus (BLRV), oba z rodu *Luteovirus* a všechny vybrané zástupce rodu *Polerovirus* (viz obrázek 13).

Obrázek 13: Fylogenetický strom vybraných zástupců čeledi *Luteoviridae* vytvořený na základě neighbor-joining analýzy celé získané sekvence (**parciální sekvence ORF 3 + ORF 5 + parciální sekvence 3' nepřekládané oblasti**) izolátu H83



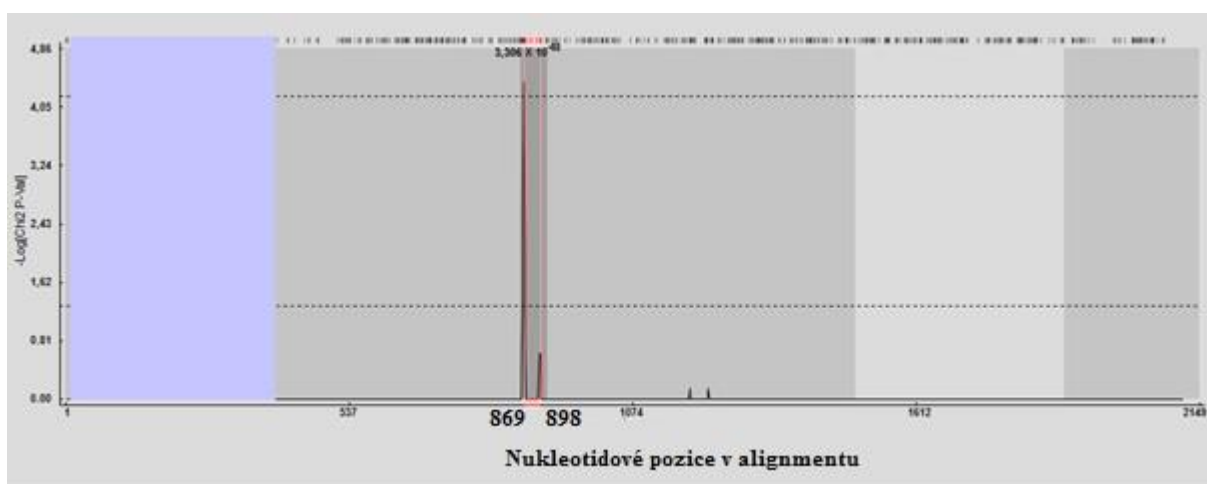
Zástupci jsou popsáni zkratkou názvu, v závorce je uvedeno Acc. No. a zkratka rodu, do kterého patří. Měřítko představuje 0,10 substitucí na pozici. Zobrazeny jsou hodnoty bootstrap ≥ 70 . Uvedení zástupci se shodují se zástupci, kteří jsou uvedeni ve fylogenetickém stromu (viz obrázek 10). Tučně je vyznačena získaná sekvence.

Rekombinační analýza

Vzhledem k rozdílnosti mezi částečnou sekvencí ORF 3 + ORF 5 a částečnou sekvencí 3' nepřekládané oblasti, která vyplývá z fylogenetických stromů (viz obrázek 10 a obrázek 12) byla provedena rekombinační analýza v programu RDP4. Byly analyzovány rekombinační události mezi sekvencí izolátu H83 (1984 nt) a celogenomických sekvencí zástupců *Barley yellow dwarf virus-GAV*, *Barley yellow dwarf virus-MAV*, *Barley yellow dwarf virus-kerII*, *Barley yellow dwarf virus-PAS*, *Barley yellow dwarf virus-PAV*, *Cherry-*

associated luteovirus, Rose spring dwarf-associated virus, Bean leafroll virus, Soybean dwarf virus, Cereal yellow dwarf virus-RPV, Potato leafroll virus, Cucurbit aphid-borne yellows virus, Beet chlorosis virus, Turnip yellows virus, Citrus vein enation virus a Pea enation mosaic virus 1, které byly přiřazeny pomocí mnohočetného aligmentu a zarovnány do bloku. Pomocí algoritmů RDP, GENECONV, BOOTSCAN/RECSCAN a MAXCHI nebyla nalezena žádná rekombinační událost mezi těmito sekvencemi. Pomocí algoritmu CHIMAERA, který informuje pouze o poloze potencionálních zlomů a neposkytuje informaci o rekombinačních událostech, byla nalezena 2 místa potencionálního zlomu v sekvenci izolátu H83 v nukleotidové pozici 869 a 898 (viz obrázek 14). Možná rekombinace mezi ORF 3 + ORF 5 a 3' nepřekládanou oblastí tímto nebyla potvrzena.

Obrázek 14: Analýza míst zlomu v sekvenci izolátu H83 pomocí algoritmu CHIMAERA v programu RDP4



7 DISKUZE

Izolace dvouvláknové RNA je jednou z možností, jak získat virovou RNA z pletiv rostlin. Druhým velmi často využívaným postupem je izolace celkové RNA. Výhodou izolace celkové RNA je možnost použití komerčně dodávaných kitů, kdy izolace pomocí těchto kitů je méně časově náročná než izolace dsRNA pomocí postupu, který popsali Morris *et* Dodds (1979) a Valverde *et al.* (1990). Pokud je izolována celková RNA z pletiv rostlin, pouze malé množství odpovídá virové RNA, v nadbytku je zde ribozomální RNA. Rwahnih *et al.* (2009) izolovali dsRNA a celkovou RNA z kůry révy vinné. dsRNA izolovali dle výše zmíněných postupů. Celkovou RNA izolovali pomocí RNeasy Plant minikitu (Qiagen). Fragmenty cDNA odpovídající dsRNA a celkové RNA byly sekvenovány a porovnány se sekvencemi v databázi GenBank. Z celkového počtu sekvenovaných cDNA fragmentů získaných z izolované dsRNA zhruba 25 % odpovídalo virovým sekvencím. Naproti tomu u cDNA fragmentů, které vznikly přepisem celkové RNA, odpovídalo virovým sekvencím méně než 1 % z celkového počtu. I přes to, že museli použít při izolaci dsRNA 10x více rostlinného materiálu než při izolaci celkové RNA, výsledky jasně naznačují, že pro studium RNA viromu byla výhodnější izolace dsRNA a její analýza.

V rámci této práce byla izolována dsRNA z višně a byl u ní detekován *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV). NSPaV patří do rodu *Luteovirus*, čeledi *Luteoviridae*. Podle Kinga *et al.* (2011) jedním z kritérií pro určení nového druhu rodu *Luteovirus* je to, že rozdíl v aminokyselinové sekvenci jakéhokoliv produktu musí být větší než 10 %. Fúzní protein, který vznikl čtením parciální sekvence ORF 3 a ORF 5 izolátu H83 vykazoval 94% identitu s fúzním proteinem NSPaV (Acc. No. ALX72766.1) vznikající translací totožných ORF, tudíž izolát H83 odpovídá NSPaV. Genom zástupců *Luteovirus* zahrnuje obvykle 4 – 6 otevřených čtecích rámců. U všech zástupců se nachází ORF 1 a ORF 2, jejichž translací vzniká RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp), ORF 3 kódující plášťový protein o velikosti 21 – 23 kDa a ORF 5. Translací ORF 3 a ORF 5 vzniká fúzní protein, který je důležitý pro přenos pomocí vektoru (Mayo *et* Ziegler-Graff, 1996).

Hlavním evolučním mechanismem podílejícím se na vzniku nových druhů u čeledi *Luteoviridae* je rekombinace. Jedním z míst, kde došlo k rekombinaci je nekódující oblast mezi ORF 2 a ORF 3. Zatímco ORF 3 je příbuzný ORF 3 u ostatních zástupců rodu *Luteovirus*, což potvrzuje i naše provedená fylogenetická analýza, gen pro RdRp u těchto virů je nejbližší příbuzný genu pro RdRp u zástupců čeledi *Tombusviridae*. U rodů *Enamovirus*

a *Polerovirus* je gen pro RdRp nejbliže příbuzný odpovídajícímu genu u členů rodu *Sobemovirus* (Gibbs *et Cooper*, 1994; Pagán *et Holmes*, 2010).

Typickým znakem genomické sekvence virů rodu *Luteovirus* je přítomnost „leaky“ stop kodonu, který se nachází mezi ORF 3 a ORF 5. U většiny zástupců se mezi těmito ORF vyskytuje „leaky“ stop kodon UAG vymezený oblastí AAA-UAG-GUA (Firth *et al.*, 2011). V získané sekvenci izolátu H83 byl identifikován „leaky“ stop kodon UGA v oblasti AGC-UGA-CGU. U referenčního genomu NSPaV (Acc. No. NC_027211.1) se vyskytuje rovněž „leaky“ stop kodon UGA, ale předcházející kodon se liší v 1 nukleotidu - AGU-UGA-CGU (nukleotidová záměna je označena tučně). Tato záměna nemá vliv na překlad do aminokyselinové sekvence, jde o tichou mutaci - kodony AGC i AGU kódují aminokyselinu serin. Podle Nida´M *et al.* (2008) je „leaky“ stop kodon UGA mezi ORF 3 a ORF 5 také přítomen v genomu *Rose spring dwarf-associated virus*, který je dle fylogenetické analýzy sekvence ORF 3 a ORF 5 nejbližším příbuzným NSPaV. Jejich příbuznost může být také vysvětlena tím, že společně s *Cherry-associated luteovirus*, se jedná o tři zástupce rodu *Luteovirus*, kteří infikují dřeviny čeledi *Rosaceae* (Bag *et al.*, 2015). Dosud nebyla popsána rekombinace u zástupců rodu *Luteovirus* v oblasti mezi ORF 3, ORF 5 a 3' nepřekládané oblasti a ani rekombinační analýza sekvence izolátu H83 s ostatními zástupci rodu *Luteovirus* tuto možnost nepotvrzuje.

Součástí genomu některých zástupců rodu *Luteovirus* je ORF 4. ORF 4 celou svou délkou překrývá ORF 3 a jeho translaci vzniká „movement“ protein. ORF 4 nebyl u izolátů NSPaV dostupných v databázi GenBank, ani u izolátu H83 identifikován. S výjimkou *Soybean dwarf virus* je v genomu všech členů rodu *Luteovirus* přítomen ORF 6, který je oddělen nekódující oblastí za ORF 5. Má se za to, že ORF 6 kóduje protein o velikosti cca 6 kDa a jeho funkce není zatím známá (King *et al.*, 2011). U NSPaV ORF 6 chybí - za ORF 5 se nachází 3' nepřekládaná oblast. Podobná struktura genomu jako u NSPaV se vyskytuje u zástupců rodu *Enamovirus* – *Pea enation mosaic virus 1* a *Citrus vein enation virus*. Jejich genom obsahuje ORF 1, ORF 2, ORF 3 a ORF 5, navíc také ORF 0, který kóduje protein s neznámou funkcí (Demler *et de Zoeten*, 1991; Vives *et al.*, 2013). Fakt, že součástí genomu zástupců *Enamovirus* není ORF 6, může vysvětlovat vznik společné větve u fylogenetické analýzy vytvořené na základě 3' nepřekládané oblasti i celé získané sekvence, která zahrnovala část ORF 3, ORF 5 a 3' nepřekládanou oblast.

Poprvé byl NSPaV popsán u broskvoně obecné (*Prunus persica*) v Kalifornii (Bag *et al.*, 2015). Výskyt NSPaV byl potvrzen v Japonsku u meruňky japonské (*Prunus mume*)

(Candresse *et al.*, 2017) a v Číně u *Prunus persica* cv. *nectarina* (Lu *et al.*, 2017). Vzhledem k nedávnému objevu NSPaV nebyl zatím publikován žádný další výskyt. Dalším zástupcem rodu *Luteovirus* infikující dřeviny, jehož výskyt byl potvrzen v České republice a jde o první nález v Evropě, je *Cherry-associated luteovirus*. Společně s NSPaV jde zatím o jediné dva druhy rodu *Luteovirus*, které napadají višně (Lenz *et al.*, 2016).

8 ZÁVĚR

Teoretická část této práce je věnována RNA virům, významu izolace a analýzy dvouvláknové RNA u rostlinných virů a charakteristice zástupců rodu *Luteovirus*.

V praktické části byla studována dvouvláknová RNA izolovaná z listů višně obecné (*Cerasus vulgaris*). Ve vzorku H83 byl detekován *Nectarine stem pitting-associated virus* (NSPaV) patřící do rodu *Luteovirus*, čeledi *Luteoviridae* a byla sestavena jeho částečná genomická sekvence. V porovnání s referenční genomickou sekvencí (NC_027211.1) byla určena pozice sekvence izolátu H83. Získaná sekvence o délce 1984 nt z celkové délky 4991 nt odpovídá částečné sekvenci ORF 3, kompletní sekvenci ORF 5 a částečné sekvenci 3' nepřekládané oblasti. I přes to, že fylogenetická analýza naznačovala možnost rekombinace mezi ORF 3 + ORF 5 a 3' nepřekládanou oblastí v rámci druhů čeledi *Luteoviridae*, rekombinace zde nebyla potvrzena.

Podle dostupných zdrojů se jedná o první nález *Nectarine stem pitting-associated virus* v Evropě.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahlquist, P. (2006): Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 371-382.
- Akin, A., Wu, C. C., Lin, T. L. (1998): A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus. *Journal of virological methods*, 74: 179-184.
- Anonymous 1: Pozitive strand RNA viruses, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/245.html, navštíveno dne: 9. 11. 2016
- Anonymous 2: Alphaflexiviridae, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/738.html, navštíveno dne: 11. 11. 2016
- Anonymous 3: Negative strand RNA viruses, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/240.html, navštíveno dne: 11. 11. 2016
- Anonymous 4: Double-stranded RNA virus replication, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/1936.html, navštíveno dne: 12. 11. 2016
- Anonymous 5: Reoviridae, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/104.html, navštíveno dne: 11. 11. 2016
- Anonymous 6: Luteoviridae, dostupné online na: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/45.html, navštíveno dne: 1. 12. 2016
- Atsumi, G., Tomita, R., Yamashita, T., Sekine, K. T. (2015): A novel virus transmitted through pollination causes ring-spot disease on gentian (*Gentiana triflora*) ovaries. *Journal of General Virology*, 96: 431-439.
- Bag, S., Al Rwahnih, M., Li, A., Gonzalez, A., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Sudarshana, M. R. (2015): Detection of a new luteovirus in imported nectarine trees: a case study to propose adoption of metagenomics in post-entry quarantine. *Phytopathology*, 105: 840-846.
- Balijja, A., Kvarnheden, A., Turchetti, T. (2008): A non-phenol–chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. *Journal of virological methods*, 152: 32-37.

- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A. (2014): Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, 6: 106-136.
- Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C., Mühlbach, H. P. (2005): Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.): *Archives of virology*, 150: 37-52.
- Blouin, A. G., Ross, H. A., Hobson-Peters, J., O'Brien, C. A., Warren, B., MacDiarmid, R. (2016): A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus enrichment in metagenomic studies. *Molecular ecology resources*, 16: 1255-1263.
- Boccardo, G., Candresse, T. (2005): Complete sequence of the RNA2 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. *Archives of virology*, 150: 403-405.
- Boccardo, G., Candresse, T. (2005): Complete sequence of the RNA1 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus *Alphacryptovirus*. *Archives of virology*, 150: 399-402.
- Buck, K. W. (1999): Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354: 613.
- Bustamante, P. I., Hull, R. (1998): Plant virus gene expression strategies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1: 13-24.
- Candresse, T., Faure, C., Theil, S., Marais, A. (2017): First Report of Nectarine stem pitting-associated virus Infecting *Prunus mume* in Japan. *Plant Disease*, 101: 393
- Cashdollar, L. W., Esparza, J., Hudson, G. R., Chmelo, R., Lee, P. W., Joklik, W. K. (1982): Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 7644-7648.
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., Burger, J. T. (2010): Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology*, 400: 157-163.
- De Haan, P., Kormelink, R., de Oliveira Resende, R., Van Poelwijk, F., Peters, D., Goldbach, R. (1991): Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 72: 2207-2216.

- Demler, S. A., De Zoeten, G. A. (1991): The nucleotide sequence and luteovirus-like nature of RNA 1 of an aphid non-transmissible strain of pea enation mosaic virus. *Journal of general virology*, 72: 1819-1834.
- Dodds, J. A., Morris, T. J., Jordan, R. L. (1984): Plant viral double-stranded RNA. *Annual review of phytopathology*, 22: 151-168.
- Domier, L. L., McCoppin, N. K., Larsen, R. C., D'Arcy, C. J. (2002): Nucleotide sequence shows that *Bean leafroll virus* has a Luteovirus-like genome organization. *Journal of General Virology*, 83: 1791-1798.
- Dougherty, W. G., Semler, B. L. (1993): Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, 57: 781-822.
- Elbeaino, T., Digiaro, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Martelli, G. P. (2009): A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology*, 90: 1281-1288.
- Firth, A. E., Wills, N. M., Gesteland, R. F., Atkins, J. F. (2011): Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic acids research*, 39: 6679–6691
- Gibbs, M. J., Cooper, J. I. (1995): A recombinational event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. *Virology*, 206: 1129-1132.
- Gildow, F. E., Ballinger, M. E., Rochow, W. F. (1983): Identification of double-stranded RNAs associated with barley yellow dwarf virus infection of oats. *Phytopathology*, 73: 1570-1572.
- Gray, S., Gildow, F. E. (2003): Luteovirus-aphid interactions. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 539-566.
- Hadidi, A. F., Olmos, A., Pasquini, G., Barba, M., Martin, R. R., Shamloul, A. (2011). Double-stranded RNAs and their use for characterization of recalcitrant viruses. *Virus*, 323-326.
- He, L., Dai, H. Y., Zhang, Z. H., Gao, X. Y., DU, G. D., Zhang, X. Y. (2007): Isolation and Identification of Virus dsRNA from Strawberry Plants. *Agricultural Sciences in China*, 6: 86-93.

- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y. Fukuhara, T. (2005): Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 57: 173-188.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus Taxonomy: 2015 Release, EC 47, London, UK, July 2015, Email ratification 2016 (MSL #30): <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Imai, M., Richardson, M. A., Ikegami, N., Shatkin, A. J., Furuichi, Y. (1983): Molecular cloning of double-stranded RNA virus genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 373-377.
- Jelkmann, W. (1995): Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *Journal of General Virology*, 76: 2015-2024.
- Jelkmann, W., Fechtner, B., Agranovsky, A. A. (1997): Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology*, 78: 2067-2071.
- Jelkmann, W., Martin, R. R., Maiss, E. (1989): Cloning of four plant viruses from small quantities of double-stranded RNA. *Phytopathology*, 79: 1250-1253.
- Jordan, R. L., Dodds, J. A., Ohr, H. D. (1983): Evidence for viruslike agents in avocado. *Phytopathology*, 73: 1130-1135.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., Carstens, E. B. (Eds.): (2011): *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Kobayashi, K., Tomita, R., Sakamoto, M. (2009): Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *Journal of General Plant Pathology*, 75: 87.
- Kormelink, R., De Haan, P., Meurs, C., Peters, D., Goldbach, R. (1992): The nucleotide sequence of the M RNA segment of tomato spotted wilt virus, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*, 73: 2795-2804.
- Kormelink, R., Garcia, M. L., Goodin, M., Sasaya, T., Haenni, A. L. (2011): Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus research*, 162: 184-202.

- Kudo, H., Uyeda, I., Shikata, E. (1991): Viruses in the phytoeovirus genus of the Reoviridae family have the same conserved terminal sequences. *Journal of General Virology*, 72: 2857-2866.
- Lenz, O., Příbylová, J., Fránová, J., Koloniuk, I., Špak, J. (2016): Identification and characterization of a new member of the genus Luteovirus from cherry. *Archives of Virology*, 1-4.
- Lu, M. G., Zhang, C., Zhang, Z. X., Wang, C. A., Li, S. F. (2017): Nectarine stem-pitting-associated virus Detected in Peach Trees in China. *Plant Disease*, PDIS-09.
- Marais, A., Faure, C., Mustafayev, E., Barone, M., Alioto, D., Candresse, T. (2015): Characterization by deep sequencing of Prunus virus T, a novel *Tepovirus* infecting *Prunus* species. *Phytopathology*, 105: 135-140.
- Mertens, P. (2004): The dsRNA viruses. *Virus research*, 101(1), 3-13.
- Miller and, W. A., Rasochová, L. (1997): Barley yellow dwarf viruses. *Annual review of phytopathology*, 35: 167-190.
- Miller, W. A., Koev, G. (2000): Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*, 273: 1-8.
- Moreno, P., Guerri, J., Muñoz, N. (1990): Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus by analysis of double-stranded RNA. *Phytopathology*, 80: 477-482.
- Morris, T. J., Dodds, J. A. (1979): Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69: 854-858.
- Nguyen, M., Haenni, A. L. (2003): Expression strategies of ambisense viruses. *Virus research*, 93: 141-150.
- Nida'M, S., Miller, W. A., Rowhani, A., Golino, D. A., Moyne, A. L., Falk, B. W. (2008): Rose spring dwarf-associated virus has RNA structural and gene-expression features like those of *Barley yellow dwarf virus*. *Virology*, 375: 354-360.
- Pagán, I., Holmes, E. C. (2010): Long-term evolution of the Luteoviridae: time scale and mode of virus speciation. *Journal of Virology*, 84: 6177-6187.
- Patton, J. T., Spencer, E. (2000): Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*, 277: 217-225.

- Roossinck, M. J., Saha, P., Wiley, G. B., Quan, J., White, J. D., Lai, H., Roe, B. A. (2010): Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology*, 19: 81-88.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2001): Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 411-420.
- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., Van der Vlugt, R., Wetzel, T. (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.
- Su, L., Li, Z., Bernardy, M., Wiersma, P. A., Cheng, Z., Xiang, Y. (2015): The complete nucleotide sequence and genome organization of pea streak virus (genus *Carlavirus*). *Archives of virology*, 160: 2651-2654.
- Trucco, V., de Breuil, S., Bejerman, N., Lenardon, S., Giolitti, F. (2016): *Bean leafroll virus* (BLRV) in Argentina: molecular characterization and detection in alfalfa fields. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 207-212.
- Tzanetakis, I. E., Keller, K. E., Martin, R. R. (2005): The use of reverse transcriptase for efficient first-and second-strand cDNA synthesis from single-and double-stranded RNA templates. *Journal of virological methods*, 124: 73-77.
- Valverde, R. A., Dodds, J. A. (1986): Evidence for a satellite RNA associated naturally with the U5 strain and experimentally with the U1 strain of tobacco mosaic virus. *Journal of General virology*, 67: 1875-1884.
- Valverde, R. A., Dodds, J. A., Heick, J. A. (1986): Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology*, 76: 459-465.
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., Jordan, R. L. (1990): Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255-258.

- Valverde, R., De La Torre-Almaraz, R. (2017): Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35
- Vives, M. C., Velázquez, K., Pina, J. A., Moreno, P., Guerri, J., Navarro, L. (2013): Identification of a new enamovirus associated with citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. *Phytopathology*, 103: 1077-1086.
- Vives, M. C., Velázquez, K., Pina, J. A., Moreno, P., Guerri, J., Navarro, L. (2013): Identification of a new enamovirus associated with citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. *Phytopathology*, 103: 1077-1086.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R., Paludan, S. R. (2006): Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of virology*, 80: 5059-5064.
- Wu, Q., Ding, S. W., Zhang, Y., Zhu, S. (2015): Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annual review of phytopathology*, 53: 425-444.
- Yanagisawa, H., Tomita, R., Katsu, K., Uehara, T., Atsumi, G., Tateda, C., Sekine, K. T. (2016): Combined DECS Analysis and Next-Generation Sequencing Enable Efficient Detection of Novel Plant RNA Viruses. *Viruses*, 8: 70.
- Zhang, Y. P., Rowhani, A. (2000): A strategy for rapid cDNA cloning from double-stranded RNA templates isolated from plants infected with RNA viruses by using Taq DNA polymerase. *Journal of virological methods*, 84: 59-63.
- Zhang, Y. P., Kirkpatrick, B. C., Smart, C. D., Uyemoto, J. K. (1998): cDNA cloning and molecular characterization of cherry green ring mottle virus. *Journal of General Virology*, 79: 2275-2281.