

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Kateřina Hradilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Viry třešní a višní
v kulturním a planém patosystému

Bakalářská práce

Kateřina Hradilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc., a že veškeré podklady, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v přehledu literatury v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis

SOUHRN

Bakalářská práce se soustředí na výskyt významných virů třešňí (*Prunus avium* L.) a višňí (*P. cerasus* L.) v kulturním a planém patosystému.

Teoretická část práce nejdříve stručně charakterizuje třešně a višně. Protože existuje velké množství virů třešňí a višňí, v práci jsou shrnuty informace pouze o virech, které byly detekovány v Evropě i v České republice (popř. hrozí jejich zavlečení do České republiky) a jsou potenciální hrozbou pro zdejší třešně a višně. Jedná se o *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry virus A* (CVA), *Little cherry-virus 1* (LChV-1), *Little cherry virus 2* (LChV-2), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringpost virus* (PNRSV), *Plum pox virus* (PPV) a *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV). Na závěr jsou popsány metody ochrany proti virovým infekcím a způsoby detekce virů.

Experimentální část práce je zaměřena na detekci a identifikaci virů třešňí a višňí pomocí polyvalentní PDO nested RT-PCR, která je určena k detekci virů patřících do rodů *Trichovirus*, *Capillovirus* a *Foveavirus*. V rámci práce se podařilo detekovat *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Cherry necrotic rusty mottle virus* a *Cherry virus A*.

SUMMARY

This bachelor's thesis is focused on the occurrence of important viruses of sweet cherries (*Prunus avium* L.) and sour cherries (*P. cerasus* L.) in cultural and wild pathosystem.

The theoretical part at first briefly characterizes cherries and sour cherries. Because so far many cherries and sour cherries viruses have been identified, it summarizes information only about viruses identified in Europe and Czech Republic (or about those that might be introduced into Czech Republic) and they might be a threat for local cherries and sour cherries. These are *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry virus A* (CVA), *Little cherry-virus 1* (LChV-1), *Little cherry virus 2* (LChV-2), *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringpost virus* (PNRSV), *Plum pox virus* (PPV) and *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV). In conclusion there are described methods of protection against viral infections and virus detection methods.

Experimental part of this thesis is focused on detection and identification of cherry and sour cherry viruses using polyvalent PDR nested RT-PCR, which is intended for detection of viruses belonging to the *Trichovirus*, *Capillovirus* and *Foveavirus* genera. It was managed to detect *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Cherry necrotic rusty mottle virus* and *Cherry virus A*.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za odborné vedení, konzultace při tvorbě práce a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat laboratornímu týmu za cenné rady a připomínky, p. Janě Veselské za pomoc v laboratoři a Ing. Evě Chrobokové, Ph.D., která mi předvedla metodu izolace nukleových kyselin, s níž jsem izolovala všechny vzorky. 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. CHARAKTERISTIKA TŘEŠNÍ A VIŠNÍ	11
3.1. Taxonomické zařazení	11
3.2. Produkce ve světě, v Evropě a v ČR.....	11
4. CHARAKTERISTIKA VIRŮ TŘEŠNÍ A VIŠNÍ	12
4.1. Nejvýznamnější zástupci virů třešň a višň	12
4.1.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV).....	13
4.1.2. <i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	14
4.1.3. <i>Cherry green ring mottle virus</i> (CGRMV).....	14
4.1.4. <i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	15
4.1.5. <i>Cherry mottle leaf virus</i> (CMLV)	15
4.1.6. <i>Cherry necrotic rusty mottle virus</i> (CNRMV)	16
4.1.7. <i>Cherry virus A</i> (CVA)	16
4.1.8. <i>Little cherry virus 1</i> a <i>Little cherry virus 2</i>	17
4.1.9. <i>Prune dwarf virus</i> (PDV)	18
4.1.10. <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV).....	18
4.1.11. <i>Plum pox virus</i> (PPV).....	19
4.1.12. <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV).....	20
4.2. Ochrana proti virovým chorobám třešň a višň v Evropě.....	20
4.2.1. Certifikační schéma pro materiál odrůd a podnoží třešně.....	21
4.2.2. Prevence proti šíření virových onemocnění třešň a višň.....	22
4.2.3. Výběr vhodných podnoží pro roubování třešň a višň.....	22
4.3. Detekce a identifikace virů třešň a višň.....	23
4.3.1. Biologické indikátory třešň a višň	23
4.3.2. DAS-ELISA	24
4.3.3. Molekulární metody.....	25
5. MATERIÁL A METODY.....	27
5.1. Biologický materiál	27
5.2. Izolace celkové RNA na oxidu křemičitém (Silica capture).....	27
5.3. Metodika PDO nested RT-PCR.....	28
5.4. Elektroforetická separace	28
5.5. Klonování PCR produktu pomocí pGEM-T kitu.....	29
5.6. Izolace PCR produktu z gelu	30

5.7.	Sekvencování výsledných produktů	30
5.8.	Bioinformatická analýza	31
5.9.	Použité chemikálie, roztoky a jejich složení	32
5.10.	Použité přístroje	33
6.	Výsledky.....	34
6.1.	Pozitivní PCR produkty	34
6.2.	Přímé sekvencování PCR produktů	34
6.3.	Sekvencování klonů PCR pozitivních vzorků	35
6.4.	<i>Cherry virus A</i> - genetická variabilita	37
6.5.	<i>Cherry necrotic rusty mottle virus</i> – genetická variabilita	39
6.6.	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> – genetická variabilita	40
7.	DISKUSE	42
8.	ZÁVĚR	45
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
10.	PŘÍLOHY	55
10.1.	Seznam vzorků.....	55
10.2.	Přehled použitých primerů.....	59
10.3.	Výskyt virů infikujících třešně a višně v České republice.....	60

1. ÚVOD

Třešně (*Prunus avium* L.) a višně (*P. cerasus* L.) patří mezi nejdůležitější peckoviny mírného pásma. Často bývají napadeny viry a virům podobnými organismy, jež způsobují vážné ekonomické ztráty snížením výnosů a kvality plodů.

Z virových infekcí třešňí a višňí jsou nebezpečné především ty infekce, které negativně ovlivňují výnos, kvalitu produkce a vitalitu stromů. Mezi typické příznaky vážných virových onemocnění třešňí a višňí patří chloróza, kroužkovitost, nekróza a mozaika listů a dále pozdní dozrávání, malý vzrůst, atypické zbarvení a trpká chuť plodů. Viry peckovin se často vyskytují v latentní infekci nebo v koinfekci s dalšími viry, což komplikuje detekci.

Důležitost virů třešňí a višňí roste s tím, že se vyskytují v kulturním patosystému. Všechny viry třešňí a višňí jsou vegetativně přenosné. Některé z nich mohou být přenášeny i hmyzími vektory a pylem. Proto je důležité pro množení třešňí a višňí používat viruprostý certifikovaný množitelství materiál, tj. zdravé rouby, očka a podnože.

Negativním dopadům virových infekcí lze předcházet výsadbou viruprostého rostlinného materiálu, regulací hmyzích vektorů použitím insekticidů a šlechtěním a pěstováním odrůd rezistentních vůči virům. Bohužel, v případě třešňí a višňí se prozatím takové odrůdy nepodařilo získat. Dalším možným způsobem ochrany zdravých rostlin a zamezení šíření virů ve výsadbách jsou agrotechnická opatření.

Bakalářská práce pojednává o nebezpečných virech třešňí a višňí, možnostech ochrany před těmito viry, jejich detekci a identifikaci. Je zaměřena na detekci a identifikaci virů třešňí a višňí a popisuje získání sekvencí virů pomocí polyvalentní PDO nested RT-PCR a sekvencování. Získané sekvence byly použity pro fylogenetickou analýzu a analyzovány na základě metody Neighbor-joining.

2. CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma "Viry třešňí a višňí v kulturním a planém patosystému".
- Zvládnutí použitých metod: odběr vzorku, izolace RNA, RT-PCR, sekvencování, bioinformatika, elektroforéza v agarózovém gelu.
- Detekce a identifikace virů ve vybraném souboru vzorků odebraných ve výsadbách genových zdrojů a z planě rostoucích stromů třešňí a višňí.
- Porovnání výskytu virů v kulturním a planém patosystému.

3. CHARAKTERISTIKA TŘEŠNÍ A VIŠNÍ

Třešně a višně patří mezi nejvýnosnější ovocné stromy mírného a subtropického pásma a jejich pěstování je důležitou součástí zemědělství z ekonomického i kulturního hlediska. Jejich plody jsou nejčastěji konzumovány přímo, popř. jsou průmyslově zpracovány a vyrábí se z nich sirupy, džusy, kompoty, marmelády, džemy a různé alkoholické nápoje, především likéry a brandy. Průměrná spotřeba čerstvých plodů v České republice na osobu za rok 2013 představuje okolo 1,1 kg třešni a 0,5 kg višni (Buchtová, 2014).

3.1. Taxonomické zařazení

Třešně a višně patří mezi krytosemenné rostliny náležící do rodu *Prunus* (slivoň), čeledi *Rosaceae* (ružovité). Rod *Prunus* zahrnuje přibližně 200 druhů a řada z nich patří mezi zásadní ovocnářské nebo okrasné druhy, které svými květy často zdobí parky a aleje měst. Patří zde např. broskvoň obecná (*P. persica* L.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.), myrobalán třešňový (*P. cerasifera* Ehrh.), sakura ozdobná (*P. serrulata* L.), slivoň švestka (*P. domestica* L.), slivoň trnka (*P. spinosa* L.) a višeň turecká neboli mahalebka (*P. mahaleb* L.). Jedná se o druhy blízkce příbuzné, a proto některé viry, které původně infikovaly třešně a višně, infikují také je, a naopak.

3.2. Produkce ve světě, v Evropě a v ČR

Světová produkce třešni za rok 2013 představovala 2 294 455 t, z čehož 841 338 t pocházelo z Evropy. Produkce višni tentýž rok čítala 1 348 628 t, z čehož 851 985 t pocházelo z Evropy (Faostat). Z celého světa vyprodukuje nejvíce třešni Turecko a nejvíce višni Ukrajina (Faostat). Celková sklizeň v českých sadech za rok 2013 představovala 7 492 t třešni a 8 017 t višni. Při sčítání plochy plodných sadů k 31. 5. 2014 byla výměra třešňových sadů odhadnuta na 886 ha a výměra višňových sadů na 1 513 ha. Ve srovnání s rokem 2012 došlo k poklesu plochy třešňových sadů o 68 ha a višňových sadů o 44 ha. I přesto, díky lepším podmínkám počasí, byla produkce třešni pro rok 2014 odhadována jako mírně nadprůměrná vůči sezóně 2013. Odhady sklizně višni pro rok 2014 představovaly meziročně 20% pokles zejména kvůli nedostatečné obnově porostů (Buchtová, 2014). Aktuálnější informace prozatím nejsou na portálu Ministerstva zemědělství k dispozici.

4. CHARAKTERISTIKA VIRŮ TŘEŠNÍ A VIŠNÍ

Všechny viry, které infikují třešně a višně, patří mezi (+) ssRNA viry (King *et al.*, 2012) a na základě životních strategií se řadí do čeledí a rodů. Některé z nich nejsou dostatečně prozkoumány, a proto nejsou zařazeny do klasifikačního systému ICTV.

Existuje velké množství virů, které způsobují různá onemocnění třešňí a višňí a projevují se velikou škálou podobných symptomů. Byla objevena řada onemocnění, která vykazují charakteristické symptomy, a předpokládá se, že jsou způsobeny ještě nepopsanými nebo nezařazenými virovými agens (Németh, 1986). Takto je tomu např. u onemocnění „bud blight disease“, u kterého se stále nepodařilo najít virus, který je jeho původcem (Kikuchi *et al.*, 2000). Onemocnění se projevuje vždy stejnými příznaky, ale bylo zjištěno, že stromy, které tyto příznaky vykazují, mohou být infikovány různými viry.

Vyšší rostliny jsou běžně napadeny několika viry současně a mnoho chorob je způsobeno jejich interakcí (Pruss *et al.*, 1997). Je časté, že infekce jedním virem je prakticky neškodná, ale při současné infekci jiným virem dochází ke značnému ovlivnění vitality a výnosu peckovin. Koinfekce je typická např. pro *Cherry virus A* (CVA), který se za běžných podmínek chová jako latentní virus (Šafařová *et al.*, 2013). Myrta *et al.* (2003) ve Středomoří detekovali koinfekci více viry až u 13% testovaných stromů třešňí.

4.1. Nejvýznamnější zástupci virů třešňí a višňí

Podle literatury již bylo identifikováno mnoho virů, které v různých částech světa prokazatelně infikují třešně a višně. Jedná se o *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *American plum line pattern virus* (APLPV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Apple stem grooving capillovirus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Carnation Italian ringspot virus* (CIRV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (CNRMV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV), *Cherry twisted leaf virus* (CTLV), *Cherry virus A* (CVA), *Little cherry-virus 1* (LChV-1), *Little cherry virus 2* (LChV-2), *Myrobalan latent ringspot virus* (MLRSV), *Petunia asteroid mosaic virus* (PAMV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV), *Prunus necrotic ringpost virus* (PNRSV), *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Dar, 2013; Dhir *et al.*, 2009; Diekmann *et al.*, 1996; EPPO, 1990; James, 2011; Jelkmann, 1995; OEPP/EPPO, 2005).

Z těchto virů byla v Evropě prokázána přítomnost ACLSV, ApMV, ArMV, CIRV, CGRMV, CLRV, CNRMV, CVA, LChV-1, LChV-2, CMLV, PAMV, PDV, PNRSV, RpRSV, SLRSV, TBRV (EPPO, 1990; Komorowska *et Ciešlińska*, 2004).

V České republice byla prozatím prokázána přítomnost pouze několika virů. U planě rostoucích třešní a višní a ve výsadbách byly detekovány četné infekce PDV a PNRSV, přičemž platí, že u třešní se častěji vyskytuje PDV a u višní PNRSV. Mezi planě rostoucími třešněmi byl přítomen jeden strom pozitivní na LChV-1 (Navrátil, osobní sdělení). V genových zdrojích a výjimečně i v kulturních výsadbách třešní a višní jsou hlášeny výskyty ACLSV, CLRV, CVA, LChV-1, LChV-2 a SLRSV (Grimová *et al.*, 2010; Chroboková *et al.*, 2012; Kumari S., 2009; Ludvíková *et al.*, 2011; Šafářová *et al.*, 2013). Ojedinele se vyskytuje PPV, který byl potvrzen u několika třešní v genofondu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. (dále jen VŠÚO Holovousy) (Navrátil *et al.*, 2004; 2008). Vyšší výskyt i četnost druhů virů v genofondu lze vysvětlit tím, že se jedná o sbírku stromů z různých zemí, kde byly dlouhodobě pěstovány. Stále není jasné, zda se viry z genových zdrojů šíří nebo ne a pokud ano, zda se šíří v kulturním nebo i v planém patosystému. Proto se dbá na preventivní opatření, např. používání zdravé sadby a likvidace zdrojů nákazy.

V následující části jsou uvedeny a charakterizovány viry třešní a višní, které jsou významné svým rozšířením a značným dopadem na výnos. Mezi viry s nejvýznamnějšími negativními dopady na třešně a višně celého světa patří ACLSV, PDV a PNRSV (Myrta *et al.*, 2003). Dále jsou charakterizovány významné viry třešní a višní, jejichž přítomnost v České republice již byla prokázána nebo hrozí jejich zavlečení z dalších států Evropy.

4.1.1. *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*

Apple chlorotic leaf spot virus patří do rodu *Trichovirus*, čeledi *Betaflexiviridae*. Stejně jako většina zástupců rodu *Trichovirus* infikuje druhy čeledi *Rosaceae*, rod *Prunus* (meruňky, broskvoně, slivoně, třešně, višně a okrasné třešně), rod *Malus* (jabloň) a rod *Pyrus* (hrušeň) (Lister, 1970; Németh, 1986). Patří mezi nejrozšířenější viry z čeledi *Betaflexiviridae* v Evropě, např. Barone *et al.* (2008) jej detekovali u 91% vzorků italských kultivarů peckovin a járovin včetně třešní. U třešní a višní byl potvrzen v Bulharsku, Francii, Itálii, Srbsku a Polsku a mimo Evropu např. v Japonsku (Ciešlińska *et al.*, 1995; Ciešlińska *et al.*, 2007; Foissac *et al.*, 2001; Mandic *et al.*, 2007; Malinowski *et al.*, 1998; Phytopathological Society of Japan, 2000). V České republice byla jeho přítomnost prokázána u třešní (Karešová *et Paprštejn*, 2001).

I když infekce virem u většiny odrůd třešní a višní nevyvolává příznaky, u citlivějších odrůd může být onemocnění (někdy nazývané jako „pseudosarka“) vážné a může se projevit různými symptomy, jejichž vážnost se odvíjí i od kmene viru. Mezi nejčastější symptomy patří rzivost slupky, kroužkovitost, nekróza a deformace listů (Eastwell *et al.*, 2005; Németh, 1986; Salmon *et al.*, 2002). Llácer *et al.* (1985) u infikovaných meruněk zjistili, že ACLSV není homogenně distribuován v rostlinných pletivech, díky čemuž mohou nastat problémy s jeho detekcí. Tuto informaci v České republice na jabloních, slivoních a třešních prověřili a potvrdili Karešová *et* Paprštejn (2001). Doposud nejsou známy žádné vektory přenosu. Pravděpodobně se nepřenáší ani semeny a šíří se pouze vegetativně (Lister, 1970).

4.1.2. *Arabid mosaic virus* (ArMV)

Arabid mosaic virus je zástupcem rodu *Nepovirus*, čeledi *Secoviridae*. Tento rod je celovětově rozšířen, primárně napadá ovocné stromy a révu vinnou (*Vitis vinifera* L.) (Brunt *et al.*, 1996; Mayo *et* Robinson, 1996). ArMV infikuje široký okruh hostitelů, např. bez černý (*Sambucus nigra* L.), ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.) a révu vinnou. Je rozšířen v Evropě, výjimkou je infekce reventu lékařského (*Rheum officinale* L.) v Kanadě (Descriptions of Plant Viruses). U třešní a višní v České republice dosud nebyl detekován.

ArMV není pro třešně a višně nebezpečný, ale v koinfekci s CLRV, PDV a PNRSV se podílí na vzniku onemocnění „cherry decline“. Onemocnění doprovází opožděné kvetení, opad listů a nedozrávání, menší vzrůst a úbytek plodů. ArMV je přenosný hád'átky *Xiphinema diversicaudatum* a *X. coxi*, semeny a vegetativně (Eastwell *et al.*, 2005).

4.1.3. *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV)

Cherry green ring mottle virus doposud není zařazen do žádného rodu, patří do čeledi *Flexiviridae*. CGRMV infikuje broskvoně, meruňky, sakury, třešně a višně. Je rozšířen v Evropě (Francie, Itálie, Polsko a Srbsko), v Africe, Chile, Japonsku, Koreji, na Novém Zélandu a v Severní i Jižní Americe (Barone *et al.* 2008; Fiore *et* Zamorano, 2013; Isogai *et al.*, 2004; Gentit *et al.*, 2002; Gilmer *et al.*, 1976; Komorowska *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Mandic *et al.*, 2007; Németh, 1986; Sabanadzovic *et al.*, 2005). Jeho výskyt v České republice prozatím nebyl potvrzen.

Nejčastějším příznakem infekce CNRMV je žlutozelená mozaika, která se objeví na dospělých listech čtyři až šest týdnů po opadu okvětních lístků. Plody jsou trpké a mohou se na nich objevovat kroužkovité nekrotické skvrny. Infekce probíhá často i latentně (Zhang *et al.*, 1998). Prozatím není znám způsob šíření viru (Li *et* Mock, 2005).

4.1.4. *Cherry leaf roll virus (CLRV)*

Cherry leaf roll virus je zástupcem rodu *Nepovirus*, čeledi *Secoviridae*. Hlavním areálem výskytu CLRV je Evropa (např. Anglie a Německo), Severní Amerika a byl potvrzen i v Chile (Cropley, 1961; Eastwell, 2010; Herrera *et Madariaga*, 2001; Rebenstorf, 2006). V České republice byl CLRV detekován u třešně, ořešáku (*Juglans regia* L.) a ostružiníku maliníku (*Rubus idaeus* L.) (Albrechtová *et Chod*, 1981; Janečková *et Pluhař*, 1987; Kumari, 2009; Novák *et Lanzová*, 1981; Polák, 2007; Smrčka, 1993). Třešně sice patří mezi původní hostitele tohoto viru, ale stejně jako ArMV infikuje i mnoho dalších druhů dřevin (což dokazuje i jeho detekce v České republice). Detekován byl např. u rodu *Betula* (bříza) ve Finsku nebo rodu *Olea* (olivovník) ve Španělsku (Bertolini *et al.*, 2003; Von Bargen *et al.*, 2009). Rebenstorf *et al.* (2006) prokázali silnou hostitelskou specifitu kmenů CLRV.

CLRV způsobuje onemocnění zvané „cherry decline“. Mezi charakteristické příznaky onemocnění patří pozdní kvetení, předčasné svinutí listů a jejich opad. Plody jsou malé, jejich produkce klesá a dozrávají cca o dva týdny později, než je běžné. V případě koinfekce s ArMV, PDV či PNRSV mívá onemocnění silnější průběh. CLRV se šíří pylem, semeny a vegetativně (Bandte *et Büttner*, 2001; Eastwell *et al.*, 2005; Jones *et al.* 1981). Dříve se předpokládalo, že jej, stejně jako ostatní viry z rodu *Nepovirus*, přenáší hád'átka (Flegg, 1969). Jones *et al.* (1981) se přiklonili k názoru, že přenos hád'átky není možný a až do současné doby nebyl tento způsob přenosu prokázán.

4.1.5. *Cherry mottle leaf virus (CMLV)*

Cherry mottle leaf virus je zástupcem rodu *Trichovirus*, čeledi *Betaflexiviridae*. Infikuje třešně v několika státech Evropy, Severní Ameriky a Jižní Afriky (Desvignes, 1999; James *et Mukerji*, 1993). Jeho dalšími hostiteli jsou třešně, sakury, broskvoně a meruňky (Németh, 1986).

CMLV je u třešně i višně původcem stejnojmenného onemocnění „cherry mottle leaf disease“. Onemocnění se zpočátku projevuje žlutým mramorováním a kadeřavěním listů. Je snížena i plodnost stromů, plody jsou menší, bez chuti a dozrávají později. Dochází k nedostatečnému koncovému růstu a zkracování internodií, čímž se vytváří deformace připomínající rozety (Gentit *et al.*, 2002). Virus se šíří roztoči *Eriophyes inaequalis* a byl popsán i vegetativní způsob přenosu. Zajímavostí je, že při přenosu vektory dochází nejprve k infekci okraje sadů (Eastwell *et al.*, 2005).

4.1.6. *Cherry necrotic rusty mottle virus (CNRMV)*

Cherry necrotic rusty mottle virus doposud není zařazen do žádného rodu, patří do čeledi *Flexiviridae*. Byl detekován u třešně v Evropě (např. ve Francii, Německu, Polsku a Srbsku), dále v Chile, Japonsku, Koreji a Severní a Jižní Americe (Cho *et al.*, 2014; Fiore *et al.*, 2013; Gentit *et al.*, 2002; Gilmer *et al.*, 1976; Isogai *et al.*, 2004; Komorowska *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008; Mandic *et al.*, 2007; Rott *et al.*, 2001a; Sabanadzovic *et al.*, 2005).

Cherry necrotic rusty mottle virus způsobuje onemocnění „necrotic mottle disease“ a v koinfekci s CGRMV často způsobuje i onemocnění „necrotic rusty mottle disease“ (Gentit *et al.*, 2002). Při obou onemocněních se pupeny na terminálních výhoncích neotevírají, nemohutní a často odumírají. Tři až šest týdnů po rozkvetení se listy deformují, vznikají na nich nekrotické skvrny a pletivo mezi žilnatinou listů vypadává. Nejvážněji postižené listy následně opadávají. Před obdobím sklizně se zbylé listy zbarví do žluta a zůstávají na nich pouze pozůstatky zeleného pletiva (Eastwell *et al.*, 2005). Mezi symptomy na kůře patří mělké trouchnivějící oblasti s ranami a červené skvrny, které patří mezi symptomy onemocnění „bud blight disease“ a jsou typické i pro infekce CNRMV, CVA a LChV-2 (Kikuchi *et al.*, 2000). Virus se šíří vegetativně, způsob jeho šíření v sadech zatím není znám a nebyl potvrzen žádný hmyzí vektor (Eastwell *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

4.1.7. *Cherry virus A (CVA)*

Cherry virus A je představitelem rodu *Capillovirus*, čeledi *Betaflexiviridae*. Jedná se o celosvětově rozšířený virus, který infikuje především třešně a višně. Na jejich kultivarech byl pozorován v Evropě (Anglii, Francii, Itálii, Německu, Polsku a Srbsku), dále v Číně, Indii, Japonsku, Kanadě a USA. Velmi často se vyskytuje v koinfekci s různými viry, např. ACLSV, CGRMV, CNRMV, LChV-1, LChV-2 nebo PDV (Barone *et al.*, 2008; Eastwell *et al.*, 1998; Gentit *et al.*, 2006; Isogai *et al.*, 2004; James *et al.*, 1998; Kirby *et al.*, 2001; Komorowska *et al.*, 2004; Mandic *et al.*, 2007; Marais *et al.*, 2012; Noorani *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2009; Sabanadzovic *et al.*, 2005). V České republice byl jeho výskyt již několikrát potvrzen (Grimová *et al.*, 2010; Šafářová *et al.*, 2013). Ve Francii, Itálii i v ČR bylo dokázáno, že infikuje nejen třešně a višně, ale i např. slivoň švestku a meruňku a také, že jednotlivé kmeny CVA vykazují značnou hostitelskou specifickou (Marais *et al.*, 2012; Svanella-Dumas *et al.*, 2005).

Vliv CVA na produkci a kvalitu plodů stále není znám. Infekce nevyvolává onemocnění a příznaky lze pozorovat jen zřídka, a to pouze na citlivých podnožích a kultivarech (Eastwell *et al.* 1998; James *et al.* 1998; Jelkmann, 1995). V koinfekci s LChV-1, LChV-2 nebo PDV dochází k projevu velmi vážných symptomů a potenciálně i k poškození kvality ovoce (Šafářová *et al.*, 2013). Znalosti o epidemiologii CVA jsou velmi omezené a neexistuje žádný důkaz o existenci vektorů a způsobu přenosu (Jelkmann, 1995).

4.1.8. Little cherry virus 1 a Little cherry virus 2

Maloplodost třešně („little cherry disease“) je onemocnění vyvolané viry LChV-1 a LChV-2 z čeledi *Closterovidae*. LChV-1 je řazen do rodu *Amplerovirus* a LChV-2 do rodu *Velarivirus*. Maloplodost třešně je celosvětově rozšířená, vyskytuje se v řadě zemí Evropy, např. v Belgii, Itálii, Německu, Polsku, Rumunsku, Řecku, Švýcarsku, Velké Británii, dále v Japonsku, USA, Kanadě a na Novém Zélandu (Büttner *et al.*, 1994; Chroboková *et al.*, 2012; Fry *et al.* 1970; Isogai *et al.* 2004; Rott *et al.* 2001b; Sabanadzovic *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1992; Wilks *et al.* 1961). V České Republice, kde byly v nedávné době pozorovány příznaky tohoto onemocnění, byly potvrzeny případy infekce virem LChV-1 i LChV-2 na třešních a višních (Ludvíková *et al.*, 2011; Chroboková *et al.*, 2012).

U symptomatických stromů bývají plody různě deformované, malé, hořké, spíše růžové barvy a dozrávají později a nerovnoměrně. Na počátku podzimu dochází u některých odrůd k zabarvování listů do červenofialova. Bylo prokázáno, že meruňky a slivoně jsou vůči maloplodosti imunní (Wilks *et al.* 1961). Přírodními hostiteli jsou ovocné okrasné druhy třešní a višní, např. sakura ozdobná (*Prunus serrulata*), stfemcha Maackova (*P. maackii*), třešň chloupkatá (*P. subhirtelia*), višň plstnatá (*P. tomentosa*), višň turecká (*P. mahaleb*) a višň vyříznutá (*P. incisa*) (Schlesingerová, 2012). Tyto druhy jsou velmi oblíbené a představují značný problém pro šíření LChV-1 a LChV-2, protože infekce u nich probíhá latentně, díky čemuž se maloplodost třešní šíří po celém světě. Oba viry se šíří infikovaným množitelským materiálem a bylo zjištěno, že LChV-2 je přenášen červcem javorovým (*Phenacoccus aceris*) (Eastwell *et al.*, 2005; Isogai *et al.*, 2004). Jedná se o polyfágní druh, který napadá mnoho druhů listnatých stromů a keřů rodu *Prunus* (Schlesingerová, 2012).

4.1.9. *Prune dwarf virus (PDV)*

Prune dwarf virus je řazen do rodu *Ilarvirus*, čeledi *Bromoviridae*. PDV je rozšířen prakticky ve všech oblastech mírného podnebí, kde jsou pěstovány druhy patřící do rodu *Prunus*. Nejčastěji infikuje višně, dále slivoně švestky, slivoně trnky, třešně a myrobalán (Németh, 1986; Polák, 2007). Na třešních a višních byl detekován např. v Itálii, Polsku, Srbsku a USA (Paduch-Cichał *et al.*, 2011; Mandić *et al.*, 2007; Sabanadzović *et al.*, 2005). V České republice jej potvrdily Jarošová *et al.* (2008) a Suchá *et al.* (2010).

PDV způsobuje onemocnění zvané „cherry yellows“, protože při něm dochází k zežloutnutí listů. Dalšími příznaky jsou deformace a zakrslost listů. U višně se onemocnění toto onemocnění projevuje nápadným zesvětlením listů přibližně 3 - 4 týdny po opadu okvětních lístků. Později se do žluta zbarví celé listy a zůstanou zelené pouze v oblasti větších žilek. Listy brzy opadávají a je redukována plodnost stromů. Na listech třešně se příznaky nemusí vůbec projevit, pokud ano, jsou patrné žluté kruhy, mozaika a proděravění. U třešně byly popsány dva izoláty PDV, jeden tvoří jemné kadeřavění listů a druhý mozaiku (Aparicio *et al.*, 1999). Infikované stromy nemusí v průběhu několika let vykazovat žádné symptomy, především nacházejí-li se v teplejším podnebí. V případě koinfekce s PNRSV je infekce vážnější a příznaky zřetelnější. Virus se šíří semeny, pylem a vegetativně (Eastwell *et al.*, 2005; Saade *et al.*, 2000).

4.1.10. *Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)*

Prunus necrotic ringspot virus patří do rodu *Ilarvirus*, čeledi *Bromoviridae*. Jedná se o celosvětově rozšířený virus. Mezi jeho okruh hostitelů patří i třešně, u kterých bývají jeho důsledky mírnější než např. u slivoní, trnek a myrobalánů. Jeho výskyt u třešně byly potvrzeny v Evropě (např. ve Francii, Německu a Srbsku), dále v Japonsku, na Novém Zélandě a v USA (Mandić *et al.*, 2007; Marbot *et al.*, 2003; Phytopathological Society of Japan, 2000; Sabanadzović *et al.*, 2005; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005). V České republice jej výskyt u třešně detekovali Polák (2007) a Jarošová *et al.* (2008).

PNRSV způsobuje onemocnění zvané „rugose mosaic“, které může být způsobeno akutní nebo chronickou infekcí. Akutní infekce se projevuje hnědými nekrotickými skvrnami na listech jedné větve nebo celé strany stromu a nastupuje koncem dubna až začátkem května. Nekrotické pletivo vypadává a listy získávají proděravělý krajkový vzhled. V některých případech se symptomy neobjeví v průběhu prvního roku nákazy, ale až v pozdějších letech. Při chronické infekci dochází ke svinutí vrcholů listů a vývinu drobných zelených výrůstků

okolo středního žebra a na spodní části listu. Často je omezen terminální růst, zkracují se internodia a bylo pozorováno i zkracování řapíků listů. Lehčí formy onemocnění vykazují příznaky na listech a nemají žádný nebo pouze malý efekt na plody. Při vážných infekcích dochází k nerovnoměrnému dozrávání plodů, vadnutí květů, redukovanému růstu výhonků a snížení celkové vitality stromů (Eastwell *et al.*, 2005). Symptomy jsou vážnější při koinfekci s PDV. PNRSV je přenášen semeny, pylem a vegetativně (Saade *et al.*, 2000).

4.1.11. Plum pox virus (PPV)

Plum pox virus je řazen do rodu *Potyvirus*, čeledi *Potyviridae*. Jeho hlavními hostiteli jsou slivoně, meruňky, broskvoně a myrobalány. Je celosvětově rozšířený, vyskytuje se v Evropě (např. v Albánii, Anglii, Francii, Itálii, na Kypru, v Lucembursku, Moldavsku, Norsku, Portugalsku, Rusku, Slovinsku, Španělsku a na Ukrajině), na severu Afriky (Egypt, Indie, Turecko, Sýrie) a dále v Argentině, Číně, Chile, Kanadě a USA (Malinowski *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 1997). Jedná se o nebezpečný virus s vážnými ekonomickými důsledky. U citlivých odrůd způsobuje 70 - 95% ztráty výnosu (Kegler, 1998; Simon *et al.*, 1997).

PPV je na základě biologických, sérologických a molekulárně-genetických charakteristik klasifikován do několika kmenů (Boscia *et al.*, 1998; Fanigliulo *et al.*, 2004, Šubr *et al.*, 2015). Nejvýznamnější jsou PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus) a PPV-Rec (Recombinant), které se šíří ve střední Evropě (Šubr *et al.*, 2015). Původním hostitelem PPV-M jsou broskve (Kamenova *et al.*, 2003), PPV-D a PPV-Rec se nachází především u slivoní (Glasa *et al.*, 2002). Méně rozšířenými kmeny jsou PPV-EA (El Amar), který je reprezentován několika izoláty pocházejícími z meruněk z Egypta (Wetzel *et al.*, 1991; Mazyad *et al.*, 1992), PPV-T (Turkey), jehož hostitelem jsou především meruňky (Serce *et al.*, 2009), a PPV-W (Winona), který byl detekován u slivoní (Sheveleva *et al.*, 2012). Na třešních se vyskytují pouze dva kmeny, kmen PPV-C (Cherry) (Kalashyan *et al.*, 1994; Nemchinov *et al.*, 1996) a nově objevený PPV-CR (Cherry - Russian) (García *et al.*, 2014; Glasa *et al.*, 2013). PPV-C byl detekován v Bělorusku, Bulharsku, Chorvatsku, Itálii, Maďarsku, Moldavsku a Rumunsku (Crescenzi *et al.*, 1997; Fanigliulo *et al.*, 2003; Kajic *et al.*, 2012; Kalashyan *et al.*, 1994; Kölber *et al.*, 1998; Malinowski *et al.*, 2012; Maxim *et al.*, 2002; Nemchinov *et al.*, 1998; Topchijska, 1996). PPV-CR byl detekován při infekci višni v Rusku (Chirkov *et al.*, 2013). I přesto, že v České republice je PPV hojně rozšířeným virem (Navrátil *et al.*, 1998), byly zde definitivně potvrzeny pouze kmeny infikující slivoně a tři vzorky třešní byly stanoveny jako podezřelé na výskyt PPV, ale nepodařilo se jej jednoznačně potvrdit (Navrátil *et al.*, 2004).

Tento virus způsobuje velmi vážně onemocnění zvané „šarka švestky“ (Németh, 1994). Příznaky u rodu *Prunus* se objevují na listech, plodech, květech a semenech a jejich vážnost se liší v závislosti na druhu, kultivaru, kmeni viru, ročním období a lokaci. Na listech a plodech třešní a višní jsou typické chlorotické a nekrotické kroužkovité vzory a nepravidelná světle zelená nebo žlutá mozaika okolo žilnatiny, často jsou ale bez příznaků. PPV je přenášen vegetativně a neperzistentně na stiletech více než dvaceti druhů mšic, z nichž přibližně čtyři patří mezi významné vektory. Jedná se o mšici bodlákovou (*Brachycaudus caudi*), mšici broskvoňovou (*Myzus persicae*), mšici chmelovou (*Phorodon humuli*) a mšici slívovou (*B. helichrysi*) (Jarošová *et al.*, 2008).

4.1.12. Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)

Strawberry latent ringspot virus doposud není zařazen do žádného rodu, pouze do čeledi *Secoviridae*. Poprvé byl popsán roku 1964 (Lister). Infikuje širokou škálu hostitelů, např. třešeň, višeň, jahodník, ostružiník maliník, vinnou révu, broskvoň a jabloň (Kumari, 2009; Lister, 1964; Taylor *et Thomas*, 1968). Na třešních a višních je rozšířen především v Evropě, dále na Novém Zélandě a v Kanadě (Allen *et al.*, 1970; Everett *et al.*, 1994; Murant, 1974). V České republice jeho výskyt u třešní potvrdili Novák *et Lanzová* (1974). Kumari (2009) se jej pokusila detekovat u broskvoní a meruněk v moravských sadech a vinicích, kde se prokazatelně vyskytuje háďátko *Xiphinema diversicaudatum* (které je vektorem ArMV a SLRSV), ale neúspěšně.

Je přenosný semeny, pylem, výše zmíněným háďátkem a mechanickou inokulací. Způsobuje skvrnitost a onemocnění zvané „cherry decline“, stejně tak jako CLRV, který patří do stejné čeledi. Příznaky tohoto onemocnění již byly vysvětleny v podkapitole věnované viru CLRV: typické je snížení výnosu, červenání a skvrnitost listů. SLRSV se vyskytuje i v koinfekci s PNRSV (Eastwell *et al.*, 2005).

4.2. Ochrana proti virovým chorobám třešní a višní v Evropě

Obecně lze konstatovat, že všechny významné viry třešní a višní jsou rozšířeny po Evropě a většina z nich i po celém světě. Výjimku tvoří např. CRLV, který byl prozatím detekován pouze v několika státech, např. v Číně, Kanadě a USA (Hansen *et al.*, 1974; James *et al.*, 2001; James *et Upton*, 2005; Ma *et al.*, 2014). Masivní šíření virů třešní a višní může být způsobeno infikovaným množitelským materiálem. Častými zdroji infekce jsou latentně infikované okrasné třešně. Jak již bylo uvedeno, viry třešní a višní se často vyskytují ve směsných infekcích. Např. Isogai *et al.* (2004) zjistili, že v některých stromech třešně ptačí

byly přítomny až čtyři viry (nejčastěji CVA, CGRMV, CNRMV a LChV-2). Je proto velmi důležité zabránit rapidnímu šíření virů používáním viruprostého množitelského materiálu.

4.2.1. Certifikační schéma pro materiál odrůd a podnoží třešně

Produkce zdravého množitelského materiálu je v Evropě zabezpečena na základě certifikačního schématu, které se týká myrobalánů, třešně a višně. Schéma je v souladu s obecným postupem, který navrhuje výbor EPPO pro certifikaci ovocných plodin a bylo přijato Radou EPPO v září 1990 (EPPO, 1990).

Certifikační schéma slouží jako podrobný návod pro produkci materiálu prostého škodlivých organismů. Je určeno pro roubované odrůdy ovocných stromů, vegetativně množené podnože a semenáče podnoží. Veškerý rostlinný materiál, který je dle certifikačního schématu vyprodukovan, je získán z tzv. předzákladního materiálu, který byl shledán viruprostým, a před předáním školkařům je materiál testován na přítomnost nejčastějších virů. Mateční rostliny (dále jen matečnice) musí být vyprodukovány v izolaci od potenciálních škodlivých organismů a zdrojů chorob.

Za účelem produkce certifikovaných výpěstků třešně je nutné držet se základních pěti kroků tohoto schématu. Nejprve je nutný správný výběr kandidátních rostlin, ty musí být vitální a bez příznaků virů a virózám podobných onemocnění. Pouze z kandidátních rostlin, které vykazují negativní výsledky pro všechny testované škodlivé organismy, mohou být vytvořeny matečnice předzákladního materiálu. Na nepřítomnost viru se testuje dvěma na sobě nezávislými metodami a všechny rostliny vykazující příznaky musí být odstraněny. Certifikační schéma vyžaduje testování ACLSV, ApMV, ArMV, PAMV, CIRV, TBSV, CGRMV, CLRV, LChV-1, LChV-2, CMLV, PDV, PNRSV, RpRSV, SLRSV a TBRV. Pro detekci se nejčastěji používají biologické indikátory, ELISA a RT-PCR. Matečnice pak musí být udržovány v podmínkách zabraňujících infekci. Proto musí být ověřeno, že půda je prostá háďátek rodů *Longidorus* a *Xiphinema*, které jsou známými vektory některých virových chorob. Každá matečnice musí být každoročně testována na PNRSV, PDV a ApMV a vizuálně kontrolována. Dalším krokem je produkce základního materiálu, a to naočkováním či naroubováním materiálu z matečnic na podnože stejné certifikační úrovně nebo na semenáče podnoží vypěstované za stejných podmínek jako matečnice předzákladního materiálu. Nakonec lze očkovaním nebo roubováním na podnože stejné nebo vyšší certifikované úrovně získat certifikované rostliny. K certifikaci je nutné, aby úřední orgán provedl kontrolu rostlin na příznaky virových a virózám podobných chorob (EPPO, 1990).

4.2.2. Prevence proti šíření virových onemocnění třešňí a višňí

Mezi základní principy prevence proti šíření virů třešňí a višňí patří vysazení zdravého materiálu, uplatňování agrotechnických opatření, vizuální prohlídky výsadeb a okolí a kontroly nepřítomnosti virových vektorů ve výsadbách. I jediný infikovaný strom ve výsadbě totiž může umožnit šíření virů na velké vzdálenosti, protože z infikovaných rostlin mohou být viry šířeny nejen vegetativně, ale v některých případech i hmyzími vektory nebo pylem. Agrotechnická opatření si kladou za cíl zamezit šíření virů ve výsadbách např. regulací jejich velikosti, dodržováním správných rozestupů mezi stromy, regulací zaplevelení a udržením dobré kvality půdy, čímž lze zamezit výskytu hád'átek a škůdců.

Důležitou součástí prevence šíření virů třešňí a višňí jsou vizuální prohlídky výsadeb a jejich blízkého okolí a bezprostřední odstranění zdrojů infekce, přičemž značný problém představují latentní infekce. Neexistují chemické ani biologické prostředky, jimiž by bylo možné léčit virová onemocnění, jako to lze u bakteriálních a houbových onemocnění (Jarošová, 2008). Jediným možným způsobem chemické ochrany je použití insekticidů proti hmyzím vektorům, které viry třešňí a višňí šíří, proto je velmi důležitý jejich monitoring.

4.2.3. Výběr vhodných podnoží pro roubování třešňí a višňí

Jak říká Lang (2001), smyslem roubování a očkování je doplnění vlastností roubu a podnože (tím může být pozitivní ovlivnění produktivity, velikosti, odolnosti, stavby stromu a architektury koruny, procesu zrání, kvality a velikosti ovoce) a odstranění negativních vlastností podnože (např. nízké plodnosti a zakrslých plodů). Komerční podnože jsou často šlechtěny tak, aby byly odolné vůči mrazu, bakteriálním onemocněním nebo virům (Long *et* Kaiser, 2010) a velmi oblíbené jsou zakrslé podnože (Lang, 2001). Rezistentní, nebo dokonce imunní odrůdy peckovin jsou jednou z možností ochrany proti virům peckovin. Typickým příkladem je šlechtění odrůd hypersenzitivních slivoní a rezistentních meruňek vůči některým kmenům PPV (Krška *et al.*, 2015; Neumüller *et al.*, 2010). Bohužel, proti virům třešňí a višňí ještě neexistují rezistentní ani imunní odrůdy.

Z planých druhů jsou jako podnože nejčastěji množeny třešně, višně a mahalebky. Mahalebky se používají jako univerzální podnože pro keřovité tvary okrasných třešňí a višňí. Třešeň se používá jako podnož pro polokmeny a vysokokmeny. Stejně tak odrůdy a kultivary sakur, které patří do toho podrodu, je nutné roubovat nebo očkovat na třešně (Lang, 2001).

4.3. Detekce a identifikace virů třešňí a višňí

Pro detekci a identifikaci virů třešňí a višňí jsou nejčastěji používány biologické indikátory a sérologické nebo molekulární metody. V poslední době jsou upřednostňovány rychlé a vysoce citlivé imunologické a molekulárně-genetické metody.

Vysvětleme si důvody použití různých detekčních metod na ukázce virů CGRMV a CNRMV. Jedinou metodou, kterou bylo donedávna možné oba viry detekovat, bylo roubování na dřevité indikátory, např. na cv. Kwanzan (*P. avium*). Byla to jediná akceptovaná a zaručená metoda pro certifikační procedury. Nicméně, používání dřevitých indikátorů je časově velmi náročné a drahé. Detekce virů pomocí dřevitých indikátorů pěstovaných ve sklenicích představuje práci nejméně na čtyři měsíce až dva roky, ve vnějších podmínkách spíše dva až tři roky (Jelkmann, 2004; Li *et Mock*, 2005; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005). Protože pro ani jeden z těchto virů nejsou dostupné komerční protilátky pro sérologickou detekci, nemohou být pro jejich identifikaci použity imunologické metody. Východiskem jsou moderní molekulárně-genetické metody, nejčastěji se používají různé varianty RT-PCR, které jsou k dispozici.

4.3.1. Biologické indikátory třešňí a višňí

Biologické testy jsou prováděny na indikátorových rostlinách. Ty se dělí na základní dva typy - indikátory bylinné a dřevité. V následující části jsou blíže popsány spolu s viry, pro které je vhodné je použít.

U bylinných indikátorů je poměrně těžké úspěšně na ně přenést inokulum. Úspěšnost a spolehlivost přenosu onemocnění závisí především na původu inokula, druhu pletiva, ze kterého vzorek pochází, ročním období, ve kterém byl vzorek odebrán a je inokulován a dále např. na složení extrakčního pufru (Németh, 1986). Přenos na bylinné indikátory se provádí mechanicky a testy trvají přibližně měsíc. Nejčastěji používanými indikátory jsou *Cucumis sativus* a *Chenopodium quinoa* nebo *Ch. amaranticolor*, které mohou být infikovány většinou druhů virů rodu *Ilarvirus* a *Nepovirus* (např. ACLSV, PDV a PNRSV) (Jelkmann, 2004). Mezi dalšími známé indikátory patří např. *Nicotiana occidentalis*, *N. obliqua* a *Phaseolus vulgaris*. Bohužel, ne všechny viry jsou mechanicky přenosné, přenos některých virů je značně problematický (např. CGRMV, CNRMV, CVA, LChV-1 a LChV-2) a bylinné indikátory pro ně proto nejsou vhodné (Isogai *et al.*, 2004).

Testy na dřevitých indikátorech jsou považovány za spolehlivější než testy na indikátorech bylinných. Přenos infikovaného materiálu se provádí roubováním nebo očkováním. Používají se semenáče broskvoně GF 305 nebo cv. Elberta, které jsou vhodné pro zachycení virů ArMV, ACLSV, CMLV, CLRV, PDV, PNRSV, ToRSV a SLRSV (Jelkmann, 2004). Velmi oblíbený je cv. Shirofugen (*Prunus serrulata*) pro detekci virů PNRSV, PDV a CGRMV a cv. Kwanzan (*P. serrulata*) pro detekci CGRMV a CNRMV (Jelkmann, 2004; Li *et* Mock, 2005). Výbornými dřevitými indikátory jsou i kultivary třešně ptačí. Jedná se např. o cv. Bing, který se používá pro detekci ArMV, CMLV, CRMV, CRLV a SLRSV, dále cv. Sam, který spolehlivě indikuje CNRMV a cv. Canindex, který je výborný pro detekci LChV-1 (Eastwell *et al.*, 2005; Jelkmann, 2004). Pro detekci PNRSV, PDV, ToRSV, ACLSV a CGRMV se dříve používala višěň plstnatá (Ogawa *et al.*, 1995). Většina dřevitých indikátorů se pěstuje ve sklenících, pouze cv. Shirofugen, cv. Kwanzan (*P. serrulata*); cv. Bing, cv. Sam a cv. Canindex (*P. avium*) se daří ve vnějších podmínkách (Jelkmann, 2004).

4.3.2. DAS-ELISA

DAS-ELISA (double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) je imunochemická metoda, jejíž podstatou je interakce antigenu a enzymem značené protilátky a následná detekce vzniklého barevného komplexu, který vzniká při reakci enzymu se substrátem. Pro detekci rostlinných virů byla poprvé použita Clarkem a Addamsem roku 1977. Jedná se o jednu z nejstarších spolehlivých metod detekce, nicméně její výsledky by měly být brány s jistou rezervou, protože distribuce viru v jednotlivých částech rostliny je různá a nepředvídatelná (Ogawa *et al.*, 1995). Další nevýhodou je, že výsledky bývají ovlivněny v závislosti na ročním období. Nejvhodnější je provádět testy na jaře (nejlépe během května či června) (Mekuria *et al.*, 2003). DAS-ELISA není vhodná pro detekci virů v nízkých koncentracích, což je typické pro směsné infekce (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005).

DAS-ELISA našla ve virové diagnostice široké uplatnění a s její pomocí lze dokázat přítomnost většiny virů, např. ACLSV, ApMV, ArMV, CGRMV, CIRV, CLRV, CMLV, CRLV, PPV, PDV, PNRSV, RpRSV, SLRSV, TRSV, TBRV, ToRSV (Jelkmann, 2004). V České republice byl touto metodou detekován např. virus ACLSV na třešních (Karešová *et* Paprštejn, 2001) a potvrdilo se, že tato metoda je pro jeho detekci vhodná a spolehlivá.

V současné době jsou komerčně dostupné různé soupravy pro imunologickou detekci zvané kity, které nabízí různé firmy. Mezi největší firmy zaměřené mimo jiné na viry třešňí a višňí patří např. švýcarská firma Bioreba AG, která nabízí DAS-ELISA kity pro ACLSV, ApMV, ArMV, ASGV, ASPV, CLRV, PDV, PNRSV, PPV, RpRSV, SLRSV, TBRV, ToRSV a TRSV (Bioreba AG).

4.3.3. Molekulární metody

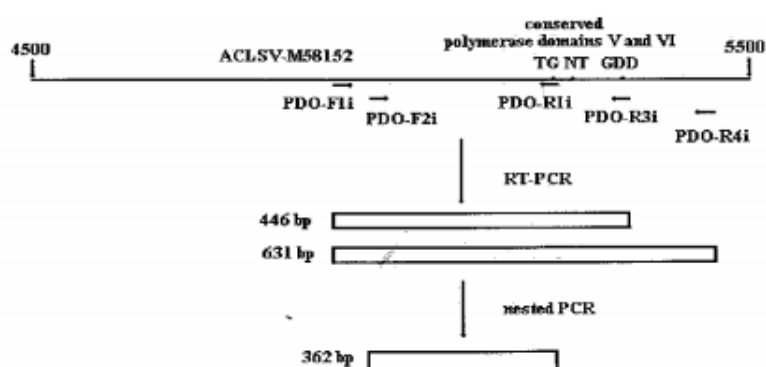
Jedná se o nejnovější metody pro detekci a identifikaci virů. Jejich výhody tkví ve vysoké specifitě a detekčních limitech. Nejširší uplatnění pro detekci virů našla metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), jejíž koncepce byla popsána roku 1983 (Saiki *et al.*, 1985). Pro detekci virů třešňí a višňí se z listů, narašených pupenů a mladých okvětních lístků izoluje tzv. celková RNA (Ludvíková *et al.*, 2011). Ta je reverzní transkripcí převedena na DNA a po PCR analyzována elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu s použitím TAE pufru (Sambrook *et al.*, 1989).

S pomocí RT-PCR lze detekovat např. APLPV, ACLSV, ApMV, ArMV, LChV-1, LChV-2, CGRMV, CLRV, CMLV, CNRMV, CVA, PPV, PDV a PNRSV (Isogai *et al.*, 2004; Jelkmann, 2004; Li *et Mock*, 2005; Rott *et Jelkmann*, 2001b; Sánchez-Navarro *et al.*, 2005). Metodiku RT-PCR lze rozdělit na tzv. one-step a two-step RT-PCR. Použitím one-step RT-PCR je redukce kroků sníženo riziko chyby a kontaminace. V případě two-step RT-PCR v první reakci dochází reverzní transkripcí k vytvoření cDNA a v druhé reakci dochází k amplifikaci cílových úseků této kyseliny (Jarošová *et al.*, 2008).

Existuje mnoho variant RT-PCR, které se osvědčily pro detekci virů. Jedná se např. o IC-RT-PCR, RT-PCR-ELISA, nested RT-PCR a multiplex RT-PCR, které si v této části stručně přiblížíme. IC-RT-PCR je spojením metody immuno capture a RT-PCR. Umožňuje specifické zachycení virových částic, používá se např. pro ACLSV, ASPV a PPV (Candresse *et al.*, 1995; Jelkmann *et Keim-Konrad*, 1997; Wetzel *et al.*, 1992). RT-PCR-ELISA je RT-PCR následovaná imunochemickou metodou ELISA, při níž se detekuje PCR produkt. Využití našla např. pro ApMV, PDV, PNRSV a ToRSV, nyní už se ale spíše nepoužívá (Candresse *et al.*, 1998; Rowhani *et al.*, 1998) a nejširší využití nacházejí metody RT-PCR, nested RT-PCR a multiplex RT-PCR.

Polyvalentní PDO nested RT-PCR (polyvalent degenerated oligonucleotide), zvyšuje citlivost amplifikace tím, že v prvním kroku se používá tzv. degenerované primery obsahující inosin, díky nimž lze zachytit sekvenčně podobné viry rodu *Trichovirus* (ACLSV a CMLV), *Capillovirus* (ASGV a CVA) a *Foveavirus* (ASPV a SCGRMV, *Sour cherry green ring mosaic virus*) (Foissac *et al.*, 2001). PDO nested RT-PCR se skládá ze dvou částí. Nejprve se provede kombinovaná RT-PCR s primery PDOF1i, PDOR3i, PDOR4i. Vznikají různě dlouhé amplikony, které za účelem zvýšení specifity podstupují další část s primery PDOF2i/PDOR1i (Obr. 1). Výslednými produkty jsou krátké homologní úseky (362 bp), které se nacházejí v oblasti RNA dependent RNA polymerase (RdRp), která je uložena ve virových genomech. Produkty potvrdí přítomnost některého z virů, ale je nutné sekvencováním určit, o jaký virus se jedná (Foissac *et al.*, 2005). Běžně se pro tento účel využívá Sangerovo sekvencování (Sanger *et al.*, 1977).

Obr. 1: Polyvalentní nested RT-PCR: Lokace primerů jsou ukázány na sekvenci viru ACLSV (schéma převzato ze článku German *et al.*, 1990)



Multiplex RT-PCR lze spolehlivě detekovat např. ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV, PDV a PNRSV (Helguera *et al.*, 2001; James, 1999; Menzel *et al.*, 2002; Saade *et al.*, 2000). Bylo ověřeno, že lze úspěšně zachytit i osm různých virů najednou (Sánchez-Navarro *et al.*, 2005). V České republice byla multiplex RT-PCR otestována přítomnost virů PDV a PNRSV na vzorcích třešní, višňů a dalších dřevin rodu *Prunus* a na její citlivost nebyl zaznamenán vliv druhu rostliny (Jarošová *et al.*, 2008). Při porovnání s metodou jednoduché RT-PCR, která je schopná v jedné reakci detekovat pouze jeden virus, je tato reakce stejně citlivá a specifická.

5. MATERIÁL A METODY

5.1. Biologický materiál

Detekce virů byla provedena v 77 vzorcích z *P. avium*, *P. mahaleb*, *P. cerasus*, *P. fruticosa*, z toho 53 vzorků pocházelo z genofondu VŠÚO Holovousy. Zbýlých 24 vzorků pocházelo z planě rostoucích stromů třešň a višň, z toho 12 z Přírodní rezervace Malý Kosíř u Olomouce a 12 z Národního Parku Podyjí. Odebrány byly minimálně 3-4 listy, pokud možno s potenciálními příznaky virové infekce, např. s chlorotickými kroužky nebo žlutozelenou mozaikou. Ze stromů, které nevykazovaly příznaky virové infekce, byly listy odebrány náhodně po obvodu koruny. Listy byly vloženy do uzavíratelných sáčků s popiskami. Seznam vzorků je uveden mezi přílohami (Tab. 2). 65-75 mg listů (pokud možno příznakových částí) bylo lyofilizováno a uchováváno při -70°C.

5.2. Izolace celkové RNA na oxidu křemičitém (Silica capture)

Celková RNA byla izolována dle modifikované metody Silica capture uvedené v publikaci Ciešlínska *et al.* (2004). Lyofilizované vzorky byly homogenizovány homogenizátorem FastPrep-24 po dobu 30 s na úrovni 5 s pufrem PBS-TPO v poměru 1:20 a centrifugovány 2 min při 12 000 rpm. Byla připravena pracovní suspenze oxidu křemičitého: do 1,5ml mikrozkušavek bylo přidáno 900 µl pufru L6 a 40 µl již připravené zásobní suspenze oxidu křemičitého, byly vortexovány a nechány 10 min při pokojové teplotě. Do zkumavek bylo přidáno 50 µl centrifugovaného extraktu a byly opět vortexovány. Přebytek supernatantu byl uschován při -70 °C. Mikrozkušavky s L6, suspenzí oxidu křemičitého a rostlinným extraktem byly ponechány 10 min při pokojové teplotě, vortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Pomocí vodní vývěvy byl opatrně odstraněn supernatant. K sedimentu bylo přidáno 900 µl pufru L2, zkumavky byly vortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Pomocí vodní vývěvy byl opatrně odstraněn supernatant. Krok promytí pufram L2 byl zopakován. K sedimentu bylo napipetováno 900 µl 70% vychlazeného ethanolu, zkumavky byly vortexovány, centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Vodní vývěvou byl opatrně odstraněn supernatant a promytí ethanolom bylo zopakováno. Sediment byl vortexován s 900 µl acetonu, centrifugován 16 s při 12 000 rpm a sušen v termobloku při 56°C v otevřených zkumavkách cca 5 min. Nakonec bylo přidáno 50 µl sterilní deionizované vody, zkumavky byly krátce vortexovány a uzavřené inkubovány 10 min při 56°C v termobloku, vortexovány a centrifugovány 16 s při 12 000 rpm. Vodní fáze byla odsáta pipetou a převedena do nové mikrozkušavky za neporušení sedimentu.

5.3. Metodika PDO nested RT-PCR

Příprava a pipetování PCR byla provedena ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Zkumavky byly po celou dobu drženy na ledu, aby se zabránilo poškození reagentů a vzorků. Sekvence všech použitých primerů jsou uvedeny mezi přílohami a jsou rozděleny do jednotlivých tabulek dle příslušných reakcí, v nichž byly použity (Tab. 3, 4 a 5).

První PCR reakce proběhla s primery PDOF1i, PDOR3i a PDOR4i v objemu 25 μ l. Reakční směs obsahovala 5 μ l pufru (5x), 12,35 μ l deionizované vody, 1,25 μ l primeru PDOF1i (20pmol/ μ l), 1,25 μ l primeru PDOR3i (20pmol/ μ l), 1,25 μ l primeru PDOR4i (20pmol/ μ l), 0,5 μ l dNTP (10 mM), 0,2 μ l Taq polymerázy (5 U/ μ l) a 0,2 μ l AMV RT polymerázy (10 U/ μ l). K reakční směsi byly přidány 3 μ l izolované DNA. Reverzní transkripce proběhla při 42 °C po dobu 45 min a následovala amplifikace v následujících krocích: predenaturace při 95 °C po dobu 3 min, 35 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 30 s, annealingu při 42 °C po dobu 30 s, syntézy cílového úseku při 72 °C po dobu 30 s a na závěr elongace při 72 °C po dobu 7 min.

PCR reakce s primery PDOF2i/PDOR1i nebo NT1/NT3 v objemu 25 μ l. Reakční směs obsahovala 2,5 μ l pufru (10x), 12,5 μ l vody, 0,75 μ l PDOF2i nebo NT1 primeru (20pmol/ μ l), 0,75 μ l PDOR1i nebo NT3 primeru (20pmol/ μ l), 2,5 μ l dNTP (2 mM), 0,2 μ l Taq polymerázy (5 U/ μ l) a 2,8 μ l MgCl₂ (25mM). K reakční směsi byly přidány 3 μ l izolované DNA. Amplifikace proběhla v následujících krocích: predenaturace při 95 °C po dobu 3 min, 35 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 30 s, annealingu při 42 °C po dobu 30 s, syntézy cílového úseku při 72 °C po dobu 30 s a na závěr elongace při 72 °C po dobu 7 min.

5.4. Elektroforetická separace

PCR produkty byly detekovány gelovou elektroforetickou separací a vizualizovány transluminátorem G:Box. Elektroforetická separace proběhla v 1% agarózovém gelu v TAE pufru (produkty PCR s primery PDOF2i/PDOR1i) a v 1,5% agarózovém gelu v TAE pufru (produkty PCR s primery NT1/NT3). Do 50 ml agarózového gelu v TAE pufru byly po mírném ochladnutí přidány 3 μ l barviva GoodViewTM. Gel byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínky, ponechán ztuhnout, obrácen a do elektroforetické komory byl nalit 1x TAE pufr a byly vyjmuty hřebínky. Jedna jamka byla naplněna 2 μ l standardu molekulové hmotnosti (Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder). Do ostatních byly aplikovány 3 μ l vzorku, které byly promíchány s 2 μ l 0,1% bromfenolové modři. Separování úseků DNA proběhlo při napětí 70-80 V a trvalo 35-45 minut, v závislosti na velikosti produktů.

5.5. Klonování PCR produktu pomocí pGEM-T kitu

Klonování PCR produktu do plazmidů pGEM-T bakterií *E. Coli* kmene DH5 α bylo provedeno pGEM-T kitem dle návodu výrobce. PCR produkty byly vysušeny v sušičce SpeedVac™ a rozpuštěny v 10 μ l vody. Ligační směs obsahovala 5 μ l pGEM-T ligačního pufru, 1 μ l ligázy, 0,5 μ l pGEM-T plazmidu, 2-3,5 μ l PCR produktu a destilovanou vodu do objemu 10 μ l. Směs byla promíchána, centrifugována a inkubována 1 h při pokojové teplotě. 5 μ l ligační směsi bylo smícháno s 50 μ l *E. Coli* rozmražených na ledu a inkubováno 20 min na ledu. Bylo přidáno 850 μ l SOC média a 1,5 hod inkubováno na rotační třepače při 37 °C. Byly připraveny kultivační misky s LB/Amp/IPTG/X-Gal médiem. LB médium bylo rozehřáno, smícháno s ampicilinem do konečné koncentrace 100 μ g/1 ml kultivačního média a rozlito do misek. Na povrch média bylo rozetřeno 200 μ l roztoku X-Gal a 20 μ l roztoku IPTG. Suspenzní kultura transformovaných buněk byla zakoncentrována centrifugací 2 min při 5 000 g. Cca 850 μ l supernatantu bylo odpipetováno a sediment byl pipetováním resuspendován ve zbytku SOC média. Resuspendované buňky byly rozetřeny na povrch média. Misky byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při 37 °C. Další den bylo provedeno vyhodnocení na základě modro-bílé selekce a pozitivní kolonie byly přeinkulovány na nové LB/Amp médium, roztaženy do menších plošek a opět inkubovány přes noc při 37 °C. Z každého klonovaného vzorku bylo vybráno 3 – 5 pozitivních kolonií s inzertem.

Byla provedena PCR s primery M13F/M13R v objemu 20 μ l. Reakční směs obsahovala 2 μ l pufru (10x), 1,2 μ l MgCl₂ (25 mM), 11,8 μ l vody, 0,2 μ l M13F primeru (20pmol/ μ l), 0,2 μ l M13R primeru (20pmol/ μ l), 2 μ l dNTP (2mM) a 0,2 μ l Taq polymerázy (5U/ μ l). V reakční směsi bylo omyto párátko, které bylo předtím namočeno v jedné z kolonií. Uvolnění a denaturace plazmidu proběhla při 95 °C po dobu 5 min, následovala PCR amplifikace: 25 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 30 s, annealingu při 55 °C po dobu 30 s, syntézy cílového úseku při 72 °C po dobu 30 s a na závěr elongace při 72 °C po dobu 10 min. PCR produkty byly detekovány na 1% agarózovém gelu. S pozitivními PCR produkty provedena elektroforetická separace pro izolaci z gelu.

5.6. Izolace PCR produktu z gelu

Izolace produktů byla provedena QIAquick Gel Extraction kitem dle pokynů výrobce. Elektroforetická separace proběhla v 1% agarózovém gelu. Bylo použito 75 ml agarózy s 5 μ l roztoku ethidium bromidu. Po ztuhnutí byl gel zalit 1x TAE pufrem a do jamek byly pipetovány veškeré PCR produkty smíchané s 5 μ l 0,1% bromfenolové modři. Separace při 80 V trvala cca 45 min. Gel byl vizualizován při 365 nm v UV transluminátoru pro vyřezávání z gelu. PCR produkty byly pod UV zářením vyřezány sterilními skalpely a vloženy do 1,5ml mikrozkuvek a zváženy. Byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1 a zkumavky byly inkubovány cca 10 min při 50 °C v dry-bloku, až do rozpuštění gelu. Dále byl přidán jeden objem isopropanolu a směs byla přemístěna do kolonky pro izolaci DNA. Postupně byl přidán QG pufr, PE pufr a kolonka se směsí byla opakovaně centrifugována. Nakonec bylo do kolonky napipetováno 30 μ l destilované vody a získaná DNA byla dlouhodobě uchovávána při -20 °C. Koncentrace DNA byla stanovena fluorometricky na přístroji Hoefer DyNA Quant 200 dle návodu. Nejmenší přípustná koncentrace byla 10 ng/ μ l. Pokud byla koncentrace nižší, vzorky byly vysušeny v sušičce SpeedVac™ a rozpuštěny v odpovídajícím objemu vody.

5.7. Sekvencování výsledných produktů

Sekvenační značení bylo provedeno Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitem (AB Applied Biosystems) dle pokynů výrobce. Složení reakční směsi bylo 1 μ l Big Dye pufru, 1 μ l Big Dye, 2 μ l sekvenačního F nebo R primeru (1,6 pmol) a 6 μ l vzorku DNA naředěného na požadovanou koncentraci. Jako vzorky byly použity PCR produkty a naklonované PCR produkty. Byly připraveny dvě série zkumavek obsahujících vzorky a reakční směs, jedna série s primerem R a druhá s primerem F. Množství použité DNA v sekvenační reakci by mělo přibližně odpovídat velikosti PCR fragmentu (pro PCR produkty délky 400 bp se používá 20 ng DNA). Amplifikace proběhla v následujících krocích: sekvenační značení při 96 °C po dobu 1 min, predenaturace při 96 °C po dobu 10 s, 40 cyklů annealingu při 50 °C po dobu 5 s, elongace při 60 °C po dobu 4 min. Vzorky byly analyzovány v genetickém analyzátoru ABI3730 na pracovišti ÚEB, AV ČR, Olomouc.

5.8. Bioinformatická analýza

Výstupy sekvencování byly sestaveny do genomových sekvencí na základě čtení forward a reverse vlákna pomocí programu SeqMan Lasergene (DNASTAR, Inc.). Sekvence klonů (získaných z kolonií, které pocházely ze stejného vzorku) byly identifikovány pomocí programu BLAST (NCBI), přičemž byly ořezány sekvence primerů pro plazmid pGEM-T, a primerů specifických pro druhý krok PDO nested RT-PCR. Multiple sequence alignment byl vytvořen pomocí programu ClustalW implementovaném v programu MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Fylogenetické vztahy byly analyzovány metodou Neighbor-joining v programu MEGA 6 metodou Bootstrap. Získaný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí modulu Tree Explorer v programu MEGA 6.

5.9. Použité chemikálie, roztoky a jejich složení

Aceton

Agarose ITM Biotechnology Grade (Amresco)

AMV reverse transcriptase M5108 (Promega)

BigDye® kit Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies)

Bromfenolová modř: 0,1% roztok v 30% glycerínu (Promega)

Destilovaná a deionizovaná voda

Ethanol: 70% a 96% roztok

Ethidium bromid 1% roztok ve vodě (Sigma)

GelRedTM Nucleic Acid Stain (Biotium)

Gene RulerTM 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

GoodViewTM Nucleic Acid Stain (SBS Genetech)

Isopropanol

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

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

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

PBS – TPO - pufr pro homogenizaci: 2 g PVP – 40, ovalbumin 0,2 g (nebo hovězí sérový albumin 0,5 g), přilít malé množství PBS – T a rozetřít, doplnit do 100 ml roztokem PBS – T

pGEM-T kit (Promega)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Suspenze oxidu křemičitého: 60 g oxidu křemičitého (Sigma S5631) – postup: rozpustit v 0,5 l vody, po 24 hodinách odstranit 430 ml tekuté části nad sedimentem, doplnit na 500 ml a silně protřepat, nechat 5 hodin sedimentovat, odstranit 440 ml tekuté části a zbytek promíchat s oxidem křemičitým a přidat pár kapek 32% HCl pro ustálení pH 2, suspenzi rozdělit do zkumavek a autoklávovat

PBS – pro vytvoření pufru pro homogenizaci vzorků: voda 800 ml, NaCl 8g, Na₂HPO₄ x 2H₂O 7,2 g, KH₂PO₄ 0,2 g, KCl 0,2 g, výsledné pH 7,4, doplnit vodou do 1 l

TAE pufr 1x – pracovní roztok: 40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA

Taq DNA polymerase Mg-free M0320 (Biolabs)

0,1M Tris/Cl: Tris 2,42 g, destil. voda 160 ml, upravit na pH 6,4, doplnit vodou do 200 ml

5.10. Použité přístroje

Analytické váhy AE 240 (Mettler)

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

DNA Fluorometr Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences)

Elektroforetická komůrka HU 10 (Scie-Plas) a MIDI I (Roth)

Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)

Inkubátor CO₂ incubator 1500 (Flow laboratories)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Lyofilizátor Heto PowerDry PL3000 (Thermo electron corporation)

Míchačka magnetická s ohřevem RCT basic (IKA ®)

Mikrovlnná trouba (DAEWOO)

Minicentrifuga Spectrafuge™ 16M (Labnet) a Prism™ Mini Centrifuge (Labnet)

MSC-3000, Centrifuge/Vortex Multispin (Biosan)

NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)

pH metr pH 211 Microprocessor (Hanna Instruents)

Přístroj na tvorbu ledu Icematic F100, Compact Ice flakers (Gemini BV)

Suchá lázeň Dry Bath-ThermaCell MiXingBlock (BIOER)

Termoblok Dri-block® DB-20 (Techne)

Termocycler T100™ (BIO-RAD)

Termocycler T-Personal (Biometra)

Thermo Savant DNA SpeedVac® SPD111V (Thermo Scientific)

Třepačka TH 30 with SM-30 control (Edmund Bühler GmbH)

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

UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)

Vakuová pumpa XF54 230 50 (Millipore)

Váhy EK-200g Lab Balance Precision Scale (A&D) a 440-33 N (KERN)

Vortex MS1 Minishaker IKA ® (Profilab)

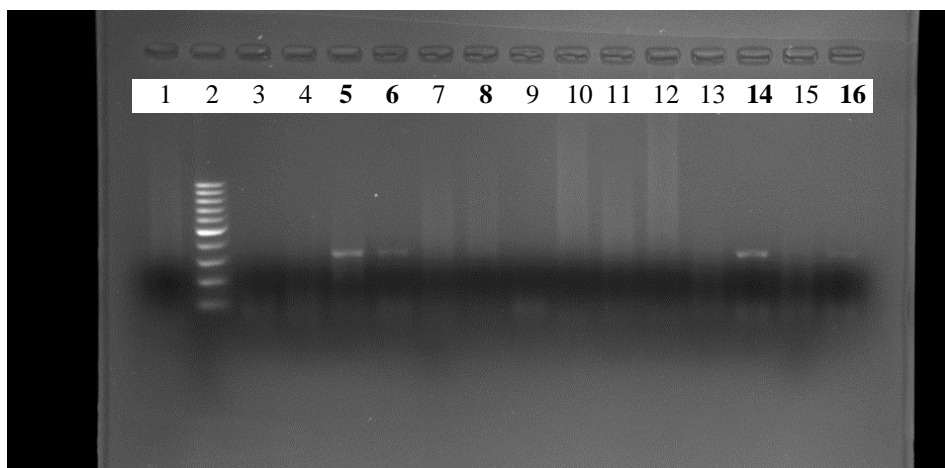
Zdroj stejnosměrného proudu Power Station 300 (Labnet) a MP-250V (BioTech)

6. Výsledky

6.1. Pozitivní PCR produkty

Přítomnost F2i/R1i PCR produktů o očekávané velikosti 362 bp byla zjištěna u 5 ze 77 vzorků (Obr. 2). A to u vzorku H 38 (*P. serrulata* cv. Kwanzan očkovaný cv. Amarelka chvalkovická), H 56 (*P. avium* cv. Grollova chrupka), H 62 (*P. avium* cv. Kišiněvskaja), H 78 (*P. avium* cv. Trušenskaja) a H 81 (*Cerasus vulgaris* cv. Amarelka chvalkovická).

Obr. 2: Detekce virů pomocí PDO nested RT-PCR (F2i/ R1i) ve vzorcích třešní a višni z genofondu VŠÚO Holovousy



Legenda: 1: H 82, 2:100 bp DNA Ladder, 3: H 54, 4: H 55, **5: H 62, 6: H 38**, 7:H 46, **8: H 56**, 9: H 65, 10: H 66, 11: H 74, 12: H 76, 13: H 77, **14: H 78**, 15: H 79, **16: H 81**; pozitivní vzorky jsou zvýrazněny tučně

6.2. Přímé sekvencování PCR produktů

Izolované PCR produkty H 38, H 56, H 62, H 78 a H 81 byly přímo sekvencovány pomocí sekvenačních primerů F2i/R1i.

Ze vzorku H 38 byla získána sekvence o velikosti 361 bp, u níž byly na 20 pozicích viditelné degenerace. Na těchto pozicích se opakovaly sekvence obsahující pár v páku, což značilo možnost směsné infekce dvěma viry. V databázi proto nebylo možné identifikovat sekvenci a bylo nutné produkt zaklonovat za účelem oddělení virových sekvencí.

Ze vzorku H 56 byla získána zcela nečitelná sekvence, z čehož bylo usouzeno, že se s největší pravděpodobností jedná o směsný, pravděpodobně nespecifický, produkt.

Ze vzorku H 62 byla získána sekvence o velikosti 358 bp. Sekvence vykazovala 98% identitu se sekvencí CNRMV (KF534766.1, *P. persica*, Černá hora), 97% identitu se sekvencí CNRMV (AF237816.1, *P. avium*, Německo) a 89% identitu se sekvencí CNRMV (EU188438.1, *P. serrulata*, Japonsko).

Ze vzorku H 78 byla získána sekvence o velikosti 352 bp, která obsahovala pík v píku. Sekvence vykazovala 95% identitu se sekvencí ACLSV (AF413955.1, *P. avium*, Francie), 83% podobnost se sekvencí ACLSV (AJ243438.1, *P. avium*, Německo) a 84% podobnost se sekvencí ACLSV (AF413948.1, *P. domestica*, Německo, 'query cover' nižší než předchozí sekvence).

Ze vzorku H 81 byla získána sekvence o velikosti 357 bp, která vykazovala 99% identitu se sekvencí CVA (FN691959.1, *P. avium*, Indie), 99% identitu se sekvencí CVA (HE574818.1, *P. avium*, Indie) a 99% identitu se sekvencí CVA (HQ267857.1, *P. avium*, Francie).

6.3. Sekvencování klonů PCR pozitivních vzorků

Za účelem zjištění potenciální variability v rámci izolátů a ověření či vyvrácení podezření na směsné infekce byly PCR produkty klonovány do pGEM-T vektoru. Téměř všechny sekvence získané sekvencováním klonovaných PCR produktů byly jednoznačně čitelné a bylo možné rozeznat sekvence směsných infekcí a porovnat je se sekvencemi virů z databáze Genbank. Stručné shrnutí detekovaných virů spolu s druhem hostitelského stromu a jeho geografickým původem je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Shrnutí původu pozitivních vzorků a v nich detekovaných virů

	Druh stromu	Původ stromu	Detekovaný virus
H 38	Indikátor cv. Kwanzan (<i>P. serrulata</i>) test „Amarelka chvalkovická“ (<i>Cerasus vulgaris</i> P. Miller)	původ: ČSSR do kolekce zařazen 1952	CVA
H 56	cv. Trušenskaja (<i>P. avium</i>)	původ: SSSR do kolekce zařazen 1975	-
H 62	cv. Kišiněvskaja (<i>P. avium</i>)	původ: SSSR do kolekce zařazen 1980	CNRMV
H 78	cv. Grollova chrupka (<i>P. avium</i>)	původ: Německo do kolekce zařazen 1952	ACLSV
H 81	cv. Amarelka chvalkovická (<i>Cerasus vulgaris</i> P. Miller)	původ: ČSSR do kolekce zařazen 1952	CVA

Sekvencováním klonů A1 až A5 (vzorek H 38) bylo získáno pět sekvencí o délce 310 bp. Nukleotidová sekvence klonu A1 neodpovídala sekvenci žádného viru. Sekvence vykazovala 100% identitu se sekvencí 'tyrosinase-related' proteinu *Vicugna pacos* (JN122622.1) a sekvencí genu pro alfa-tubulin *Phytophthora cinnamoni* (AM412177.1) a 99% identitu s parciální sekvencí 16S rRNA genu nespecifikované endofytické bakterie (HE815278.2). Sekvence klonů A2 a A4 (dále jen CVA-A) byly zcela identické a vykazovaly 95% identitu se sekvencí CVA (AY792509.1, *P. domestica*, Francie), 95% identitu se sekvencí CVA (EU730949.1, *P. mume*, Čína) a 94% identitu se sekvencí CVA (EU730950.1, *P. mume*, Čína). Sekvence klonů A3 a A5 byly téměř identické (dále CVA-B), lišily se ve dvou záměnách pyrimidinových a purinových bází: v pozici 20 (A3/A5 - C/T) a v pozici 273 (A3/A5 - A/G). Vykazovaly 99% identitu se sekvencí CVA (AY944066.1, cv. Bing, USA), 98% identitu se sekvencí CVA (AY944065.1, cv. Colt, USA) a 98% identitu se sekvencí CVA (AY944064.1, cv. Kwanzan, USA).

Sekvencováním klonů E1 až E4 (vzorek H 56) byly získány čtyři sekvence o délce 310 bp. Ani jedna ze sekvencí klonů nevykazovala podobnost s virovými sekvencemi. Klon E1 vykazoval 99% identitu se sekvencí hypotetického proteinu *P. mume* (XR 514408.1), sekvencí chloroplastové DNA *P. kansuensis* (KF990036.1) a se sekvencí plastidu *P. mume* (KF765450.1). Klon E2 vykazoval 93% identitu se sekvencí *Pseudomonas* (CP007638.1) a sekvencí *Pseudomonas fluorescens* (CP003041.1) a 84% identitu se sekvencí *Pseudomonas fluorescens* (AM181176.4). Klon E3 vykazoval 100% identitu se sekvencemi *Paenibacillus polymyxa* (NR 117732.1, NR 117731.1 a NR117729.1). Klon E4 vykazoval 98% identitu se sekvencí klonovacího vektoru pDuExAc6 (GU370778.1), rostlinného expresního vektoru pDuExAn6 (EF565883.1) a rostlinného expresního vektoru pDuExAn1 (EF565882.1).

Sekvencováním klonů B1 až B3 (vzorek H 62) byly získány tři sekvence o délce 310 bp. Klon B1 vykazoval 99% identitu se sekvencí mikrosatelitové DNA *Cocos nucifera* (AJ865276.1) a 98% identitu se sekvencemi hypotetického proteinu z *P. mume* (XM 008232550.1) a *P. persica* (XM 007216829.1). Klony B2 a B3 byly dlouhé 310 bp, téměř identické, lišily se jedinou záměnou purinových bází na pozici 225 (B2/B3 - G/A). Jejich sekvence vykazovaly 99% identitu se sekvencí CNRMV (AF237816.1, *P. avium*, Německo), 98% identitu se sekvencí CNRMV (KF534766.1, *P. persica*, Černá Hora) a 89% identitu se sekvencí CNRMV (EU188438.1, *P. serrulata*, Japonsko).

Sekvencováním klonů C1 až C5 (vzorek H 78) bylo získáno pět sekvencí o délce 310 bp. Sekvence klonů C1, C2, C3 a C5 byly zcela identické a vůči sekvenci klonu C4 se lišily ve dvou pozicích: v pozici 104 (C1, C2, C3, C5/C4 – A/C) a v pozici 258 (C1, C2, C3, C5/C4 – T/C). Sekvence klonu C1 vykazovala 100% identitu se sekvencí ACLSV (AF413955.1, *P. avium*, Francie), 85% identitu se sekvencí ACLSV (AB326223.1, hostitelský druh neuveden, Japonsko) a 84% identitu se sekvencí ACLSV (AB326224.1, hostitelský druh neuveden, Japonsko). Sekvence klonu C4 vykazovala 94% identitu se sekvencí ACLSV (AF413955.1, *P. avium*, Francie), 84% identitu se sekvencí ACLSV (AJ243438.1, hostitelský druh neuveden, Německo) a 83% identitu se sekvencí ACLSV (AF413949.1, *P. persica*, Germany).

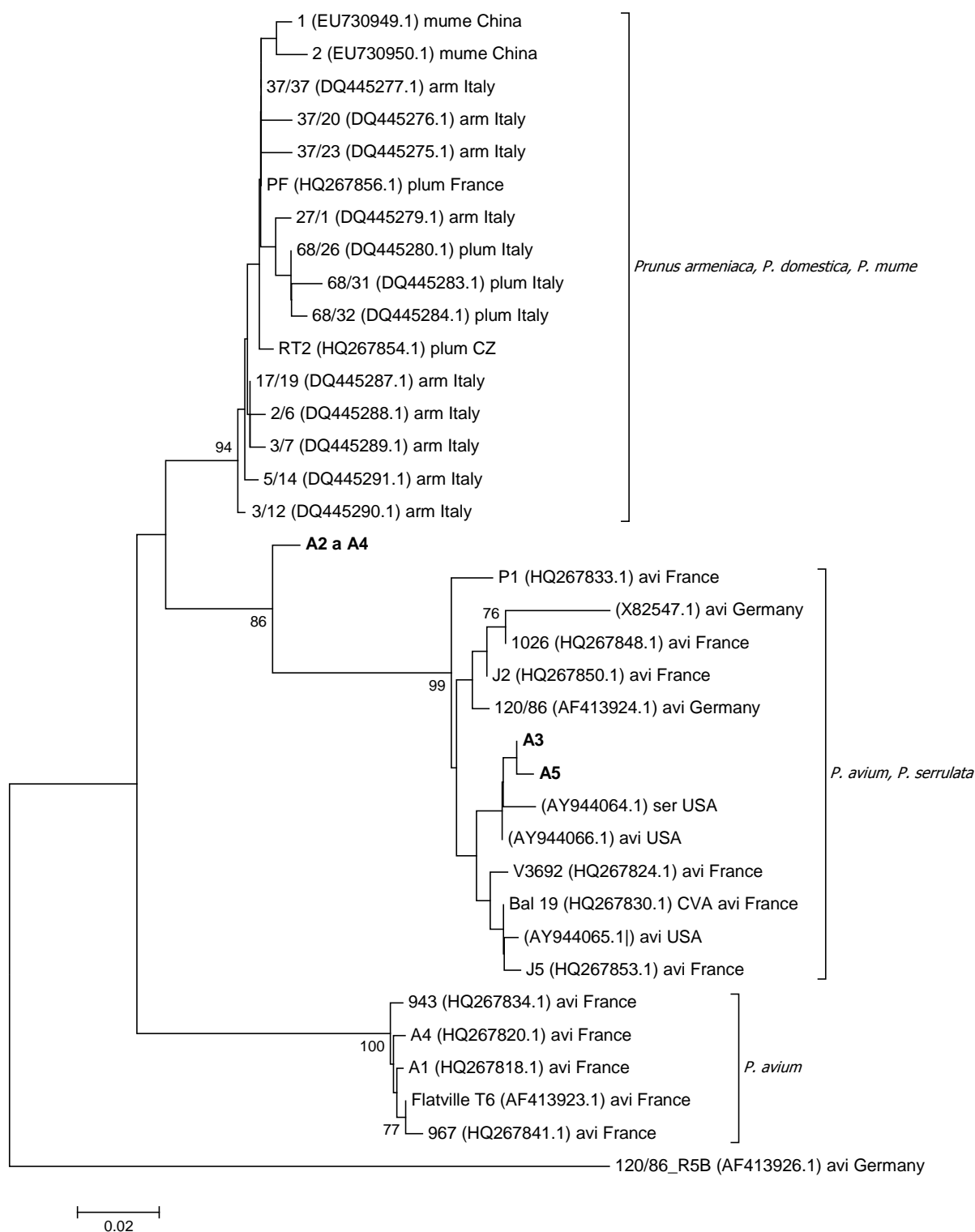
Klony D1 až D5 (vzorek H 81) se nepodařilo osekvencovat. Po prvním přímém sekvencování sice sekvence vykazovala identitu s různými izoláty CVA, které pocházely z *P. avium* a *P. persica*, ale po zaklonování byla sekvence nečitelná.

6.4. *Cherry virus A* - genetická variabilita

Cherry virus A (CVA) se podařilo detekovat ve vzorku H 38 (indikátor *P. serrulata* cv. Kwanzan očky inokulovaný z cv. Amarelka chvalkovická) a H 81 (cv. Amarelka chvalkovická (*Cerasus vulgaris* P. Miller). Sekvence H 81 byla příliš odlišná od sekvencí klonů vzorku H 38, a proto není ve fylogenetickém stromu uvedena. Po provedení multiple sequence alignment byl na základě neighbor-joining analýzy klonů CVA-A a CVA-B s dalšími sekvencemi CVA získanými z databáze Genbank vytvořen fylogenetický strom (Obr. 3).

Fylogenetický strom je členěn na tři klastry. První klastr představují izoláty pocházející převážně z Itálie z *P. armeniaca* a *P. domestica* a dva izoláty původem z *P. mume* z Číny. Do druhého klastru jsou zahrnuty evropské izoláty z *P. avium*, v rámci klastru se nachází i český izolát CVA-B (klony A3 a A5), který vykazuje nejvyšší podobnost s izolátem *P. serrulata* z USA (AY944064.1) a izolátem *P. avium* z USA (AY944066.1). Třetí klastr je tvořen evropskými izoláty CVA z *P. avium*. Druhý český izolát CVA-A (klony A2 a A4) nepatří do žádného z uvedených klastrů a tvoří samostatnou větev.

Obr. 3: Fylogenetický strom izolátů CVA sestavený na základě neighbor-joining analýzy



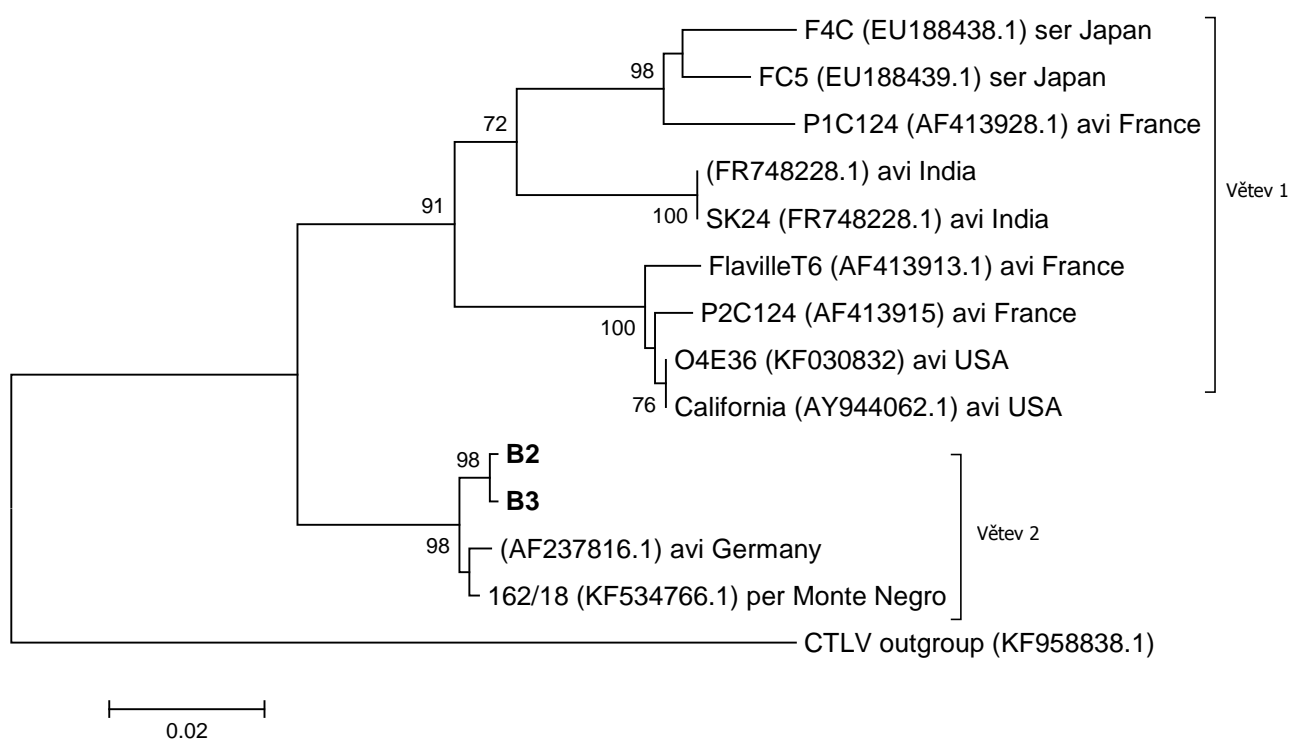
Izoláty popsány jménem, Accesion Number (v závorce), hostitelem a zemí původu. Měřítko znázorňuje 0,02 substitucí na pozici. Zobrazeny hodnoty bootstrap ≥ 70 . Legenda: arm (*P. armeniaca*), avi (*P. avium*), mume (*P. mume*), plum (*P. domestica*), ser (*P. serrulata*), outgroup: AF413926.1.

6.5. *Cherry necrotic rusty mottle virus* – genetická variabilita

Cherry necrotic rusty mottle virus (CNRMV) se podařilo detekovat ve vzorku H 62 (klony B2 a B3, *P. avium*, cv. Kišíněvskaja). Po provedení multiple sequence alignment byl na základě neighbor-joining analýzy s dalšími sekvencemi CNRMV získanými z databáze Genbank vytvořen fylogenetický strom (Obr. 4).

Fylogenetický strom se skládá ze dvou průkazně fylogeneticky naprosto odlišných větví. První větev je velmi silně diverzifikovaná a obsahuje izoláty z *P. avium* a *P. serrulata* původem z Francie, Indie, Japonska a USA. Druhá větev obsahuje český izolát (klony B2 a B3, liší se pouze v jedné pozici), izolát pocházející z *P. avium* z Německa (AF237816.1) a broskvoňový izolát z Černé hory (KF534766.1).

Obr. 4: Fylogenetický strom izolátů CNRMV na základě neighbor-joining analýzy



Izoláty popsány jménem, Accession Number (v závorce), hostitelem a zemí původu. Měřítka znázorňují 0,02 substitucí na pozici. Zobrazeny hodnoty bootstrap ≥ 70 . Legenda: avi (*P. avium*), per (*P. persica*), ser (*P. serrulata*), outgroup: KF958838.1.

6.6. *Apple chlorotic leaf spot virus* – genetická variabilita

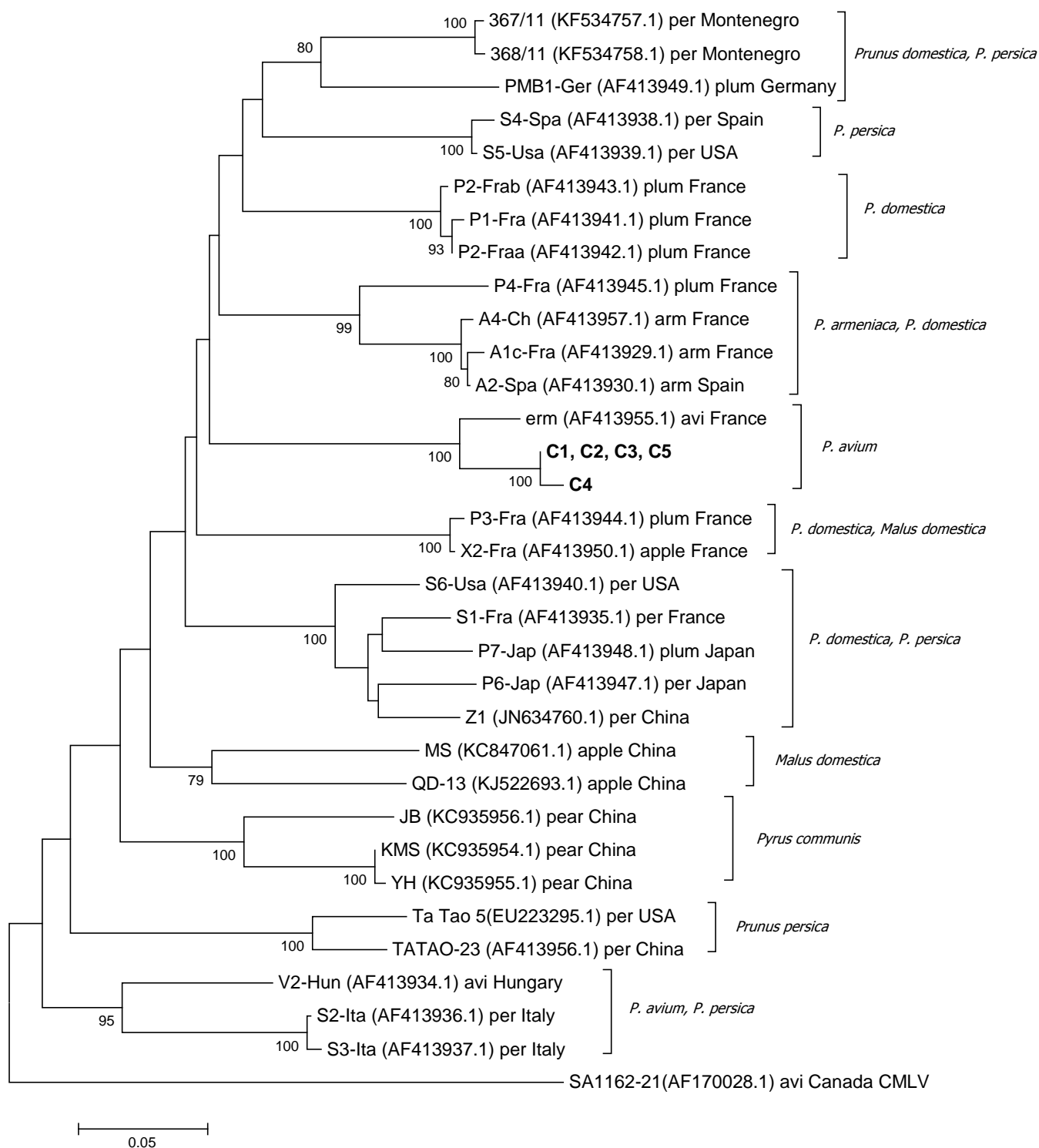
Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) se podařilo detekovat ve vzorku H 78 (klony C1 až C5, *P. serrulata*, cv. Grollova). Po provedení multiple sequence alignment byl na základě neighbor-joining analýzy s dalšími sekvencemi CNRMV získanými z databáze Genbank vytvořen fylogenetický strom (Obr. 5).

Izoláty ACLSV jsou velmi variabilní a na fylogenetickém stromu lze rozlišit jedenáct větví, na kterých je patrná hostitelská i geografická korelace. Vzhledem k délce hodnocených sekvencí (310 bp) a jejich variabilitě není možné definovat společného předka.

První větev zahrnuje izoláty z *Prunus domestica* a *P. persica* z Černé hory a Německa. Druhá větev se skládá z izolátů z *P. persica* ze Španělska a USA. Třetí větev je tvořena pouze izoláty z *P. domestica* z Francie. Čtvrtá větev se skládá z izolátů detekovaných na *P. armeniaca* a *P. domestica*, které pocházejí z Francie a Španělska. Pátá větev se skládá výlučně z izolátů získaných z *P. avium*. Patří zde izolát z Francie a naše české izoláty C1 až C5, přičemž C1, C2, C3 a C5 se vůči C4 liší na dvou pozicích. Šestou větev tvoří izoláty pocházející z *P. domestica* a *Malus domestica* z Francie. V sedmé větvi jsou izoláty z *P. domestica* a *P. persica* z Francie, USA a Japonska. Osmá větev zahrnuje pouze izoláty viru z *M. domestica* z Číny a devátá větev pouze izoláty z *Pyrus communis* z Číny. Desátá větev je tvořena izoláty získanými z *P. persica* z USA a Číny a poslední větev se skládá z izolátů z *P. avium* a *P. persica* z Maďarska a Itálie.

Zaměříme-li se např. na výskyt ACLSV na *P. avium*, zjistíme, že se vyskytuje v Evropě (Francie, Maďarsko a naše vzorky z České republiky), a že všechny izoláty patří do stejné větve a jsou si velmi podobné. Podobně např. sekvence ACLSV pocházející z *P. armeniaca* jsou řazeny do stejné větve (pochází z Francie a Španělska).

Obr. 5: Fylogenetický strom izolátů ACLSV na základě neighbor-joining analýzy



Izoláty popsány jménem, Accession Number (v závorce), hostitelem a zemí původu. Měřítko znázorňuje 0,05 substitucí na pozici. Zobrazeny hodnoty bootstrap ≥ 70 . Legenda: apple (*M. domestica*), arm (*P. armeniaca*), avi (*P. avium*), plum (*P. domestica*), pear (*Pyrus communis*), per (*P. persica*), outgroup: AF170028.1.

7. DISKUSE

Viry CVA, CNRMV a ACLSV byly detekovány pouze u odrůd a biologických indikátorů, které jsou součástí genofondu VŠÚO Holovousy. Původním předpokladem bylo, že mezi planě rostoucí druhy třešň a višň ještě nejsou viry zavlečeny tak moc, jako je tomu v genových zdrojích. V souboru planě rostoucích třešň a višň nebyl detekován žádný virus, což s tímto předpokladem plně koresponduje. Tím se potvrdila původní domněnka, že planě rostoucí druhy třešň a višň České republiky prozatím nejsou viry příliš ohroženy. K vysoké míře infekcí v genofondech přispívá fakt, že často obsahují i infikované stromy, které mohou být dovezeny z různých zemí. Řada z nich byla dovezena už před rokem 1990, tedy dříve, než bylo sepsáno Certifikační schéma pro třešeň (EPPO).

Cherry virus A byl v České republice již několikrát detekován (Grimová *et al.*, 2010; Šafářová *et al.*, 2013). V okolních státech byl jeho výskyt potvrzen v Německu (Jelkmann, 1995) a v Polsku (Komorowska *et Ciešlińska*, 2004) a dále v Evropě u třešň a višň v Anglii, Francii, Itálii a Srbsku (Barone *et al.*, 2008; Kirby *et al.*, 2001; Mandić *et al.*, 2007; Marais *et al.*, 2012). V rámci této bakalářské práce se CVA podařilo detekovat ve vzorcích H 38 a H 81. Vzorek H 38 pocházel z indikátoru cv. Kwanzan (*P. serrulata*), který byl testem pro cv. Amarelka chvalkovická (*Cerasus vulgaris*), který pochází z ČSSR a do kolekce patří od roku 1952. Vzorek H 81 byl taktéž odebrán z cv. Amarelka chvalkovická (*Cerasus vulgaris*), který byl do kolekce zařazen roku 1952. Sekvence CVA ze vzorku H 81 byla příliš odlišná od sekvencí klonů vzorku H 38, a proto není ve fylogenetickém stromu uvedena.

Cherry necrotic rusty mottle virus se v České republice doposud nepodařilo detekovat. Jeho výskyt na třešních a višních v Evropě byl prozatím potvrzen ve Francii, Srbsku, Německu a Polsku (Mandić *et al.*, 2007; Rott *et Jelkmann*, 2001a). Tato práce je tedy první publikací popisující výskyt CNRMV v České republice. Virus byl detekován na cv. Kišiněvskaja (*P. avium*), který pochází ze SSSR a do kolekce byl zařazen roku 1980.

Apple chlorotic leaf spot virus již byl u třešň v České republice potvrzen (Karešová *et Paprštejn*, 2001). V Evropě byly jeho výskyty u třešň a višň potvrzeny v Bulharsku, Francii, Itálii, Srbsku a v Polsku (Barone *et al.* (2008); Ciešlińska *et al.*, 1995; Ciešlińska *et al.*, 2007; Foissac *et al.*, 2001; Mandić *et al.*, 2007; Malinowski *et al.*, 1998). V rámci práce byl ACLSV detekován na cv. Grollova chrupka (*P. avium*) pocházejícím z Německa, který je součástí kolekce genofondu od roku 1952.

Pro detekci virů pomocí PDO nested RT-PCR byly použity degenerované primery. Při práci s nimi je nutné si uvědomit, že může nastat možnost nespecifické amplifikace. To se potvrdilo hned v několika případech u výsledků sekvencování PCR produktů po zaklonování. Klon A1 (vzorek H 38) vykazoval nejvyšší podobnost se sekvencemi 'tyrosine-related' proteinu *Vicugna pacos*, genu pro alfa-tubulin *Phytophthora cinnamoni* a parciální sekvencí 16S rRNA genu nespecifické endofytické bakterie. Klon B1 (vzorek H 62) vykazoval nejvyšší podobnost s mikrosatelitovou DNA a hypotetickými proteiny z *P. mume* a *P. persica*. K nespecifické amplifikaci došlo i u všech klonů vzorku H 56 (klonů E1 – E4). Po přímém sekvencování byla ze vzorku H 56 získána zcela nečitelná sekvence, s největší pravděpodobností se tedy mohlo jednat o směsný či nespecifický produkt. Po zaklonování ale sekvence klonů neobsahovaly virovou RNA. Klon E1 vykazoval nejvyšší podobnost se sekvencemi hypotetického proteinu *P. mume*, chloroplastové DNA *P. kansuensis* a s plastidem *P. mume*. Klon E2 vykazoval nejvyšší podobnost se sekvencemi genomů *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas fluorescens*. Klon E3 byl nejvíce podobný se třemi různými sekvencemi rRNA genu *Paenibacillus polymyxa* a klon E4 vykazoval nejvyšší podobnost se sekvencí klonovacího vektoru pDuExAc6, rostlinného expresního vektoru pDuExAn6 a rostlinného expresního vektoru pDuExAn1.

Drobné odlišnosti, které jsou patrné mezi některými klony (A3 vůči A5, B2 vůči B3 a C4 vůči shodným izolátům C1, C2, C3 a C5) si lze vysvětlit jako tzv. quasispecies. Jedná se o varianty viru, které jsou spolu úzce příbuzné, ale zároveň odlišné. Nejedná se o různé izoláty virů, protože tato odlišnost je příliš malá.

Za různé izoláty viru bychom mohli považovat případ, který nastal u vzorku H 38, v němž byl detekován CVA. Sekvencováním a fylogenetickou analýzou bylo potvrzeno, že *Cerasus vulgaris* byla pravděpodobně infikována směsnou infekcí dvou izolátů tohoto viru, jelikož každý se nachází v jiné části fylogenetického stromu – izolát CVA-A (klony A2 a A4) nepatří do žádného klastru (ale má blíže spíše k prvnímu klastru) a izolát CVA-B (klony A3 a A5), který jednoznačně patří do druhého klastru. Po sekvencování byly klony A2 a A4 vůči sobě zcela identické a mezi klony A3 a A5 byla patrná lehká variabilita na již zmíněných dvou pozicích, kterou lze vysvětlit právě quasispecies.

Pro virus CVA je typická koinfekce jinými viry, např. ACLSV, CGRMV, CNRMV, LChV-1, LChV-2 nebo PDV (Barone *et al.*, 2008; Eastwell *et Bernardy*, 1998; Gentit *et al.*, 2006; Isogai *et al.*, 2004; James *et Jelkmann*, 1998; Kirby *et al.*, 2001; Komorowska *et Cieślińska*, 2004; Mandic *et al.*, 2007; Marais *et al.*, 2012; Noorani *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2009; Sabanadzovic *et al.*, 2005). Koinfekci se však ve vzorcích nepodařilo prokázat.

Mezi hostitele CVA patří nejen *P. avium* a *Cerasus vulgaris*, ale také *P. domestica* a *P. armeniaca* a jak vyplývá z fylogenetické analýzy, tak i okrasné dřeviny *P. serrulata* a *P. mume*. Marais *et al.* (2012) a Svanella-Dumas *et al.* (2005) tvrdí, že jednotlivé kmeny CVA vykazují značnou hostitelskou specifitu. Výskyt hostitelské specifity potvrzují výsledky fylogenetické analýzy genetické variability CVA uvedené v této práci, kde lze vidět, že např. sekvence virů z České republiky z hostitele *P. domestica*, jsou v jiném klastru, než izoláty nově získané v rámci této bakalářské práce z dřevitého indikátoru cv. Kwanzan (*P. serrulata*) pro „Amarelka chvalkovická“ (*Cerasus vulgaris*), které jsou podobnější kmenům z USA a Francie infikujících především *P. avium*.

Hostitelem CNRMV je téměř výlučně *P. avium* (Li *et Mock*, 2005), což potvrzuje provedená fylogenetická analýza. V analýze jsou uvedeny i izoláty viru, které byly detekovány u vzorků získaných z *P. persica* z Černé hory a z *P. serrulata* z Japonska.

U fylogenetické analýzy pro ACLSV je taktéž patrná určitá hostitelská a geografická specifita. Nové izoláty získané v rámci této bakalářské práce pocházející z *P. avium* z České republiky jsou podobné izolátům z *P. avium* z Francie a jsou velmi odlišné od izolátů získaných z *P. domestica* z Francie a Německa. Na fylogenetickém stromu je patrný široký okruh hostitelů, mezi něž patří jabloně, hrušně, třešně, meruňky i slivoně, což popisují také Lister (1970) a Németh (1986). Hypotézu hostitelské specifity potvrzují bootstrap hodnoty, které jsou největší až u koncových větví, což spolu s uvedenými druhy hostitelů naznačuje, že došlo k brzké diverzifikaci viru a izoláty ACLSV se mezi sebou liší především v závislosti na hostiteli.

8. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce ve své literární rešerši charakterizuje viry třešňové a višňové významné pro Českou republiku. Dále popisuje možné způsoby prevence a ochrany třešňové a višňové vůči virům.

Praktická část se zabývá detekcí a fylogenetickou analýzou tří detekovaných virových druhů. Výskyt virů byl potvrzen pouze v genofondu VŠÚO Holovousy s.r.o.. Byla prokázána přítomnost *Cherry virus A*, *Cherry necrotic rusty mottle virus* a *Apple chlorotic leaf spot virus*. V případě CNRMV se jedná o první potvrzený výskyt v České republice. V planě rostoucích třešňových a botanických druzích (tj. *Prunus mahaleb* a *P. fruticosa*) na přirozených stanovištích nebyl potvrzen výskyt viru. Výsledky potvrdily epidemiologický význam importovaných položek genových zdrojů jako rizikového faktoru pro šíření nových virů.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Albrechtová L., Chod J. 1981. Identification of viruses in sweet cherry trees (*Prunus avium* L.) with symptoms similar to cherry leaf roll. In: Plant Virology. Proceedings 9th Conference Czechoslovak Plant Virologists, Brno: 17-20.
- Allen W. R.; Davidson T. R., Bristol M. R. 1970. Properties of a strain of strawberry latent ringspot virus isolated from sweet cherry growing in Ontario. *Phytopathology* 60: 1262-1265.
- Bandte M., Büttner C. 2001. Occurrence, transmission and diagnosis of *Cherry leafroll Nepovirus* – a literature review. *Pflanzenschutzberichte* 59: 1-19.
- Barone M., Alioto D., Ragozzino A., Candresse T. 2008. Investigation on occurrence of *Tricho-*, *Fovea-* and *Capilloviruses* in ancient fruit tree cultivars in Campania. *Acta Horticulturae (ISHS)* 781: 53-58.
- Bertolini E., Olmos A., López M. M., Cambra M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in Olive Trees. *Phytopathology* 93: 286–292.
- Bioreba AG [online]. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: <http://www.bioreba.ch/>.
- Boscia D., Myrta A., Potere O., Cambra M., Crescenzi A., Di Terlizzi B., Candresse T., Savino V. 1998. Impiegi di anticorpi monoclonali per l'identificazione dei diversi ceppi del virus della violosatura delle drupace (PPV). *Not. Prot. Piante* 9: 207-212.
- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L. 1996. *Viruses of Plants*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 1484.
- Buchtová, Irena. 2014. *Ovoce: Situační a výhledová zpráva*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR. ISBN 978-80-7434-175-5.
- Büttner C., Jelkmann Q., Graf H. 1994. Zum Auftreten der Kleinfrüchtigkeit der Süßkirsche (little cherry disease) in Erwebsobstanlagen. *Erwebs-Obstbau* 1: 10–13.
- Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinovsky T., Dunez J. 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Hort.* 386: 136-147.
- Candresse T., Cambra M., Dallot S., Lanneau M., Asensio M., Gorris M. T., Revers F., Macquaire G., Olmos A., Boscia D., Quiot J. B., Dunez J. 1998. Comparison of monoclonal antibodies and PCR assays for the typing of isolates belonging to the D and M serotypes of plum pox virus. *Phytopathology* 88: 198-204.
- 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.
- Cieślińska M., Borisova A., Komorowska B. 2007. Some molecular properties of several isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from Bulgaria. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 15: 125-131.

- Clark N. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 – 483.
- Crescenzi A., d'Aquino L., Comes S., Nuzzaci M., Piazzola P., Boscia D., Hadidi A. 1997. Characterisation of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease* 81: 711 – 714.
- Cropley R. 1961. Cherry-leaf-roll virus. *An. Appl. Biol.* 49: 524-529.
- Dar N. A. 2013. Apple Stem Grooving Virus – A Review Article. *International Journal of Modern Plant and Animal Sciences*, 1: 28 – 42.
- Diekmann M., Putter C. A. J. 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.
- Dhir S., Tomar M., Thakur P. D., Ram R., Hallan V., Zaidi A. A. 2009. Molecular evidence for *Apple stem pitting virus* infection in India. 19:45.
- Desvignes J. C., Boye R., Cornaggia D., Crasseau N. 1999. *Virus Diseases of Fruit Trees*. Ctifl, Paris.
- Eastwell K. C., Bernardy M. G. 1998. Relationship of *Cherry virus A* to little cherry disease in British Columbia. *Acta Horticulturae* 472: 305-31.
- Eastwell K. C., Grove G. A., Johnson D. A., Mink G. I., Byther R. S., Covey R. P., Parker R., 2005. *Field Guide to Sweet Cherry Diseases in Washington*. Washington State University Press.
- EPPO 1990. Schéma pro produkci zdravých sazenic: Certifikační schéma pro třešeň. OEPP/EPPO.
- EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization. [online].[cit.2015-04-04]. Dostupné z: http://www.eppo.int/QUARANTINE/documented_pests.html.
- Everett K. R., Milne K. S., Forster R. L. S., 1994. A new host record: strawberry latent ringspot virus isolated from flowering cherry. *Australasian Plant Pathology* 23: 11-15.
- Fanigliulo A., Comes S., Maiss E., Piazzola P., Crescenzi A. 2003. The complete nucleotide sequence of Plum pox virus isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Arch. Virol.* 148: 2137-2153.
- Fanigliulo A., Comes S., Crescenzi A. 2004. Evaluation of cherry cultivars for their response to infection by plum pox virus sweet cherry strain. In *Proceedings of the sixth international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fit crops: Fruit tree diseases*. 309-316.
- Faostat: Food and agricultural organization of the United nations.[online].[cit.2015-02-27]. Dostupné z: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
- Foissac X. L., Svanella-Dumas L., Dulucq M. J., Gentit P. 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* 550: 37 – 43.
- Foissac X. L., 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.

- Fiore N., Zamorano A. 2013. First report of *Cherry green ring mottle virus* and *Cherry necrotic rusty mottle virus* in sweet cherry (*Prunus avium*) in Chile and South America. *Plant disease* 97 (8): 1122.
- Flegg J. J. M. 1969. Tests with potential nematode vectors of *cherry leaf roll virus*. In: Report of East Malling Research Station for 1968: 115.
- Fry P. R., Wood G. A. 1970. Little cherry virus in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 13:1, 111-118.
- García J. A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*. 15(3): 226 – 241.
- Gentit P., Foissac X., Svanella-Dumas L., Peypelut M., Macquaire G., Candresse T. 2002. Molecular characterization of foveaviruses associated with the cherry necrotic mottle leaf disease and complete sequencing of an European isolate of *Cherry green ring mottle virus*, *Arch. Virol.* 147: 1033 - 1042.
- Gentit, P., Marais, A., Charlot, G., and Millan, M. 2006. Cherry decline: CVA a suspect virus? *Current status and results for 2005. Infos-Ctifl* 223: 35-40.
- German S., Candresse T., Lanneau M., Huet J. C., Pernellet J. C., Dunez J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organisation of apple chlorotic leaf spot closterovirus. *Virology* 179: 104 – 112.
- Glasa M., Marie-Jeanne V., Labonne G., Šubr Z., Kúdela O., Quiot J. B. 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *Eur J Plant Pathol* 108: 843-853.
- Glasa M., Prikhodko Y., Predajna L., Nagyova 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.
- 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.
- Hansen A. J., Nyland G., McElroy F. D., Stace-Smith R. 1974. Origin, cause, host range and spread of cherry rasp leaf disease in North America. *Phytopathology* 64: 721-727.
- Helguera P. R., Taborda R., Docampo D. M., Ducasse D. A. 2001. Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* in the peach. *J. Virol. Methods* 95. 93 – 100.
- Cho I. S., Choi G. S., Choi S. K. 2014: First report of *Cherry necrotic rusty mottle virus* infecting sweet cherry trees in Korea. *Plant disease*, 98 (1): 164.
- Chroboková, E., Suchá, J., Ludvíková H., Zouhar M. 2012. Occurrence of the little cherry disease in the Czech republic. *Acta fytotechnica et zootechnica, Special Number/2012*: 16-20.
- Isogai M., Aoyagi J., Nakagawa M., Kubodera Y., Satoh K., 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.
- James D., Jelkmann W. 1998. Detection of *Cherry virus A* in Canada and Germany. *Acta Horticulturae (ISHS)* 472: 299-303.

- James D., Mukerji S. 1993. Mechanical transmission, identification, and characterization of a virus associated with mottle leaf in cherry. *Plant Disease* 77: 271–275.
- James D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods* 83: 1-9.
- James D., Howell W. E., Mink G. I. 2001. Molecular evidence of the relationship between a virus associated with flat apple disease and *Cherry rasp leaf virus* as determined by RT-PCR. *Plant Dis.* 85: 47-52.
- James D., Upton C. 2005. Genome segment RNA-1 of a flat apple isolate of *Cherry rasp leaf virus*: nucleotide sequence analysis and RT-PCR detection. *Arch Virol* (2005) 150: 1469-1476.
- James D. 2011. Cherry twisted leaf disease and its associated virus. In: *Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits*. (Eds. Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W.) American Phytopathological Society (APS) Press. Chapter 28: 143-146.
- Janečková M., Pluhař Z. 1987. Výsledky testů na přítomnost virů v matečných rostlinách odrůd a novošlechtění maliníku. *Zahradnictví*, 14: 267 - 277.
- Jarošová J., Polák J., Kumar J. 2008. Metodika molekulární detekce virů peckovin pomocí RT-PCR a multiplex-RT-PCR. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008, 25 s. ISBN 978-80-87011-86-7.
- 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 cherry virus, a mealybugtransmissible closterovirus. *Journal of General Virology*, 78: 2067 - 2071.
- Jelkmann W., Keim-Konrad R. 1997: Immuno-captive polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of *apple stem pitting virus*. *J. Phytopathol.*, 145: 499-503.
- Jelkmann W. 2004. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. Laboratory assays, bioassays and indicators. *Acta Hort* 657 (ISHS) 2004.
- Jones A. T., McElroy F. D., Brown D. J. F. 1981. Tests for transmission of *cherry leaf roll virus* using *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* nematodes. *Annals of Applied Biology*, 99: 143–150.
- Kajic V., Černi S., Škoric D. 2012. *Plum pox virus* on sour cherry in Croatia. In: 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome, Book of Abstracts. 157.
- Kalashyan A. A., Bilkey N. D., Verderevskaya T. D., Rubina E. V. 1994. *Plum pox virus* on sour cherry in Moldava. *EPPO Bull.* 24: 645-649.
- Kamenova V., Milusheva S., Borisova A., Stoev A., Myrta A. 2003. *Plum pox virus* strains in Bulgaria. *Options Méditerranéennes, serie B*, 45: 65-67.
- Karešová R., Paprštejn F. 2001. *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulture*, 550: 259-264.
- Kegler H., Fuchs E., Grüntzig M., Schwarz S. 1998. Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta Virol.* 42, 200-215.

- Kikuchi S., Toshida K., Sato Y., Ishiguro M. 2000. Studies on cherry bud blight. First Research on actual condition and cause of sweet cherry bud blight. *Bull Yamagata Hortic Exp Stn* 13: 11-20.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz E. J. 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham, MA: Academic Press, c2012, x, 1327 p. ISBN 01-238-4684-6.
- Kirby M. J., Kirby M. J., Adams A. N. 2001. Occurrence of *Cherry virus A* in the UK. *Plant Pathology*, 50: 801.
- Komorowska B., Cieślińska M. 2004. First report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant Disease*, 88 (8): 909.
- Komorowska B., Fiore N., Zamorano A., Li R. 2014: Simultaneous detection of *Cherry necrotic rusty mottle virus* and *Cherry green ring mottle virus* using real-time PCR and high resolution melting analysis. *Molecular and Cellular Probes* 28: 186-191.
- Kölber M., Németh M., Tokés G., Krizbai L., Szonyegi S., Ember I., Bereczky Z. S., Pocsai E., Hangyál R., Vollent Á., Bencze E., Papp E., Pete A., Hajnóczy G. Y., Kiss E., Imre P., Takács M., Mero F. 1998. A five-year study to determine the eventual occurrence of plum pox virus in cherry cultivars in Hungary. *Acta Hort.* 472: 495-502.
- Kumari S. 2009. Detection of *Cherry leaf roll virus* and *Strawberry latent ring spot virus* by one-step RT-PCR. *Plant Protect. Sci.* 45: 140-143.
- Krška B., Vachůn N., Nečas T., Ondrášek I. 2015. New sharka resistant apricots at the Horticultural faculty in Lednice. *Acta Hort.* 1063 (ISHS) 2015.
- Lang G. A. 2000. Precocious, Dwarfing, and Productive – How Will New Cherry Rootstocks impact the sweet cherry industry? *HorTechnology* 10(4): 719 – 725.
- Lang G. A. 2001. Intensive Sweet Cherry Orchard Systems – Rootstocks, Vigor, Precocity, Productivity and Management. *The compact fruit tree*, 34 (1): 23–26.
- Lee S., Yea M., Back Ch., Choi K., Kang I., Lee S., Jung H. 2014. Survey of *Cherry necrotic rusty mottle virus* and *Cherry green ring mottle virus* incidence in Korea by Duplex RT-PCR. *Plant. Pathol. J.* 30(4): 445-449.
- Liberti D., Marais A., Svanella-Dumas L., Dulucq M. J., 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(4): 420–426.
- Li R., Mock R. 2005. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexiviruses in *Prunus* spp. *J. Virol. Methods*, 129: 162-169.
- Li R., Mock R. 2008. Characterization of a flowering cherry strain of *Cherry necrotic rusty mottle virus*. *Arch Virol* 153: 973–978.
- Llácer G., Cambra M., Lavina A. and Aramburu J. 1985. Suitable condition for detecting apple chlorotic leaf spot virus in apricot trees by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Agronomie* 5 (9): 809-812.
- Lister R. M. 1964. Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. *Annals of Applied Biology* 54: 167-176.

- Lister R. M. 1970. Apple chlorotic leaf spot virus. In: Description of Plant Viruses [online]. (cit. 2015-03-23).
- Long L. E., Kaiser C. 2010. Sweet cherry rootstocks. Corvallis, OR: Oregon State University.
- Ludvíková H., Suchá J., Křivohlávková L., Jelkmann W. 2011. Diagnostics of Little Cherry Disease (LChD). *Vědecké práce ovocnářské*, 22: 129-133.
- Ma Y. X., Li J. J., Li X. D., Zhu S. F. 2014. First report of *Cherry rasp leaf virus* infecting cherry in Shandong province, China. *Journal of Plant Pathology*.
- Malinowski T., Komorowska B., Cieślińska M., Zawadzka B., Candresse T. 1998. Characterization of SX/2, an *Apple chlorotic leaf spot virus* isolate showing unusual coat protein properties. *Acta Horticulturae (ISHS)* 472: 43–50.
- Malinowski T., Cambra M., Capote N., Zawadzka B., Gorriss M. T., Scorza R., Ravelonandro M. 2006. Field trials of plum clones transformed with the Plum pox virus coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Dis.* 90: 1 012 – 1 018.
- Malinowski T., Sowik I., Salavei A. V., Kukharchyk N. V. 2012. Partial characterisation of biological properties of PPV-C isolates found in Belarus and establishment of in vitro cultures of infected L2 and OWP-6 rootstocks. In: 22nd International Conference on Virus and other graft transmissible diseases of fruit crops, Rome, Book of abstracts. 152.
- Mandic B., Matic S., Rwahnih M. A., Jelkmann W., Myrta A. 2007. Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 89: 103-108.
- Marais A., 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 ringpost virus* in fruit trees. *Plant Disease*. 87: 1344 - 1348.
- Maxim A., Ravelonandro M., Isac M., Zagrai I. 2002. Plum pox virus in cherrytrees, VIIIth Int Plant Virus Epidemiology Symposium, Aschersleben (Germany) 12th – 17th May. 101.
- Mayo M. A., Robinson D. J. 1996. Nepoviruses: Molecular biology and replication. In: Harrison B. D: Murant A. E. (eds): *The Plant Viruses, Polyhedral Virions and Bipartite RNA*. Vol 5. Plenum, New York: 139-185.
- Mazyad H. M., Nalhla M. K., Abo Elela A., El Hammady M. H. 1992. Occurrence of *plum pox (sharka) virus* on stone fruit trees in Egypt. *Acta Hort.* 309: 119-124.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods* 99: 81-92.
- Mekuria G., Ramesh S. A., 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*). *J. Virol. Methods* 114. 65 – 69.
- Murant A. F. 1974. Descriptions of plant viruses. (126) CMI/AAB. 4.

- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., Matelli G. P. 2003. Virus diseases affecting the Mediterranean stone fruit industry: a decade over surveys. In: Myrta A. (ed.), Di Terlizzi B. (ed.), Savino V. (ed.). Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. Bari: CIHEAM, 2003. p. 15-23.
- Navrátil M., Šimonová V., Fialová R., Válová P. 1998. Molecular variability of Czech plum pox virus isolates. *Acta Virologica* 42: 254-256.
- Navrátil M., Šafařová D., Crescenzi A., Fanigliulo A., Comes S., Petrzik K., Karešová R. 2004. The Occurrence of PPV in Cherry Trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 657: 273–244.
- Navrátil M., Šafařová D., Gaiou S., Fránová J., Kučerová J., Taláčko L. 2008. The partial molecular characterization of *Plum pox virus* infecting sweet cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 781: 20–208.
- NCBI: Blast. [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.
- Nemchinov L. G., Hadidi A. 1996. Characterization of the sour cherry strain of *plum pox virus*. *Phytopathology*, 86: 575-580.
- Nemchinov L. G., Hadidi A., Kölber M., Németh M. 1998. Molecular evidence for the occurrence of *Plum pox virus* – cherry subgroup in Hungary. *Acta Hort.* 472: 503-508.
- Németh M. 1986. Virus, Mycoplasm and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Dordrecht: Martinus Nijhoff. 272-381.
- Németh M. 1994. History and importance of *Plum pox* in stone-fruit production. *EPPO Bull.* 24, 525–536.
- Neumüller M., Hartmann W., Petruschke M., Treutter D. 2010. The hypersensitivity resistance of european plum to the Plum pox virus and its potential impact on the epidemiology of the virus. *Julius-Kühn-Archiv*, 427.
- Noorani M. S., Awasthi P., Singh R. M., Ram R., Sharma M. P., Singh S. R., Ahmed N., Hallan V., Zaidi A. A. 2010. Complete nucleotide sequence of *Cherry virus A* (CVA) infecting sweet cherry in India. *Archives of Virology*, 155: 2079-2082.
- Novák J. B., Lanzová J. 1974. Sérologická identifikace viru svinutky třešně na některých dřevinách v Československu. In: *Sborník Vysoké školy zemědělské*, Praha: 205–223.
- Novák J. B., Lanzová J. 1981. Virus svinutky třešně z ořešáku vlašského (*Juglans regia*) v Československu. *Ochrana Rostlin*, 17: 1-8.
- OEPP/EPPO 2005. EPPO Standards PM 7/49 (1) *Tomato ringspot nepovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO* 35: 313-318.
- Ogawa J. M., Zehr E. I., Bird G. Q. 1995. Plu Pox Virus. From the Compendium of Stone Fruit Diseases. APS press, USA. 98.
- Paduch-Cichał E., Sala-Rejczak K., Mroczkowska K., Boscia D., Potere O. 2011. Serological characterization of *Prune dwarf virus* isolates. *51 (4)*: 389–392.
- Polák J. 2007. Viruses of blackthorn and road-bordering trees of plum, myrobalan, sweet and sour cherries in the Czech republic in the Czech republic. *Plant Protection Science* 43: 1–4.
- Phytopathological Society of Japan 2000. Common name of plant disease in Japan, 1st ed. Japan Plant Protection Association, Tokyo, str. 403.

- Pruss G., Ge X., Shi X. M., Carrington J. C., Vance V. B. 1997. Plant Viral Synergism: The Potyviral Genome Encodes a Broad-Range Pathogenicity Enhancer That Transactivates Replication of Heterologous Viruses. *The Plant Cell*. 9: 859–868.
- Rao W. L., Zhang Z. K., Li R. 2009. First report of *Cherry virus A* in sweet cherry trees in China. *Plant Disease*, 93: 425.
- Rebenstorf K., Candresse T., Dulucq M. J., Büttner C., Obermeier C. 2006. Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leaf roll virus. *Journal of Virology* 80: 2453–2462.
- Rott M. E., Jelkmann W. 2001a. Complete nucleotide sequence of *Cherry necrotic rusty mottle virus*. *Arch Virol* 146: 395-401.
- Rott M. E., Jelkmann W. 2001b. Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, *Little cherry virus-2*. *Phytopathology* 91: 261 - 267.
- Rowhani A., Biardi L., Routh G., Daubert S. D., Golino D. A. 1998. Development of a sensitive colorimetric PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Dis* 82: 880-884.
- Saade M., Aparicio F., Sánchez-Navarro J. A., Herranz M. C., Myrta A., di Terlizzi B., Pallas V. 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 1330–1336.
- Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Rowhani A., Grant J. A., Uyemoto J. K. 2005. Detection of *Cherry virus A*, *Cherry necrotic rusty mottle virus* and *Little cherry virus 1* in California orchards. *Journal of Plant Pathology*, 87: 173-177.
- Salmon M. A., Vendrame M., Kumert J., Lepoivre P. 2002. Detection of *apple chlorotic leaf spot virus* using a 5' nuclease assay with a fluorescent 3' minor groove binder-DNA probe. *J. Virol. Methods*, 104: 99-106.
- Sambrook J., Fritsch F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F., Niklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sánchez-Navarro J. A., Aparicio F., Herranz M. C., Minafra A., Myrta A., Pallás V. 2005. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 111: 77-84.
- Schlesingerová G. 2012. Maloplodost třešně: *Little cherry disease*. 7 s. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/177973/Listovka_maloplodost_tresne.pdf.
- Simon L., Saenz P., Garcia J. A. 1997. Filamentous viruses of woody plants. Chapter 7 Plum pox virus. Edited by P. Monette. Trivandrum, India. Research Singpost. 75–86.
- Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Haris K. M. 1992. *Cherry little cherry disease*. CAB International, Wallingford, UK. 888–892.
- Smrčka L. 1993. The occurrence of *arabis mosaic*, *tomato black ring* and *strawberry latent ringspot nepoviruses* and *cucumber mosaic cucumovirus* in raspberry (*Rubus idaeus*) near Prague. *Ochrana Rostlin*, 29: 87-92.

- 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. Hort. Sci. (Prague), 37: 118-120.
- Svanella-Dumas L., Marais A., Gentit 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., Paprštejn F., Candresse T., Marais A. 2013. Cherry virus A infecting cherries and plums in the Czech Republic - Short communication. Hort. Sci. Prague 40: 37-39.
- Šubr Z., Kamencayová M., Glasa M. 2015. Experimental mixed infection by *Plum pox virus* strains confirms their natural host preference. Acta Hort. 1063 (ISHS): 29-32.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30, 2725-2729.
- Taylor C. E., Thomas P. R. 1968. The association of *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletzky) with strawberry latent ringspot and arabis mosaic viruses in a raspberry plantation. Annals of Applied Biology 62: 147-157.
- Topchijska M. 1996. *Plum pox virus* in some *Prunus* spp. In Bulgaria. In: Middle European Meeting on Plum Pox, Budapest, 2-4 October. Pp. 27.
- Vitushkina M., Fechtner B., Agranovsky A., Jelkmann W. 1997. Development of an RT-PCR for the detection of *Little cherry virus* and characterization of some isolates occurring in Europe. Eur J Plant Pathol 103: 803-808.
- Von Barga S., Grubits E., Jalkanen R., Büttner C. 2009. *Cherry leaf roll virus* – an Emerging Virus in Finland? Silva Fennica 43 (5): 727-738.
- Wilks J. M., Welsh M. F. 1961. Host range studies of the *Little cherry disease virus*. (41): 544-548.
- Wetzel T., Candresse T., Ravelonandro M., Delbos R. P., Mazyad H., Aboulata A. E., 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., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J., 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. J. Virol. Methods 39. 27–32.
- Zhang Y. P., Kirkpatrick B. C., Smart C. D., Uyamoto J. K. 1998. cDNA cloning and molecular characterization of CGRMV. Phytopathology 79: 2275-2281.

10. PŘÍLOHY

10.1. Seznam vzorků

Tab. 2: Seznam všech použitých vzorků

Vzorek	Lokalita	Druh stromu	Datum sběru
H 31	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/15)	29. 5. 2013
H 32	Holovousy	“GF 305“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15)*	29. 5. 2013
H 33	Holovousy	“Canindex“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15a)*	29. 5. 2013
H 34	Holovousy	“Sam“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15a)*	29. 5. 2013
H 35	Holovousy	“Bing“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15)*	29. 5. 2013
H 36	Holovousy	“Bing“ Amarelka chvalkovická (strom 2/16)*	29. 5. 2013
H 37	Holovousy	“Canindex“ Amarelka chvalkovická (strom 2/16)*	29. 5. 2013
H 38	Holovousy	“Kwanzan“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15a)*	29. 5. 2013
H 39	Holovousy	“Bing“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15a)*	29. 5. 2013
H 40	Holovousy	LChV-2 (IPO Dossenheim)	29. 5. 2013
H 41	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/16 – 3)	29. 5. 2013
H 42	Holovousy	“GF 305“ Amarelka chvalkovická (strom 2/15 – 5)*	29. 5. 2013
H 43	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/15a – 5)	29. 5. 2013
H 44	Holovousy	LChV-1 (InHort Skierniewice)	29. 5. 2013
H 45	Holovousy	“Canindex“ Amarelka chvalkovická 2/15*	29. 5. 2013
H 46	Holovousy	“Shiro plum“ Amarelka chvalkovická 2/15a - 1*	29. 5. 2013
H 47	Holovousy	“Sam“ Amarelka chvalkovická 2/15*	29. 5. 2013
H 48	Holovousy	“Kwanzan“ Amarelka chvalkovická 2/16*	29. 5. 2013
H 49	Holovousy	“Sam“ Amarelka chvalkovická 2/16*	29. 5. 2013
H 50	Holovousy	“Shiro plum“ Amarelka chvalkovická 2/16 - 3*	29. 5. 2013

Vzorek	Lokalita	Druh stromu	Datum sběru
H 51	Holovousy	“Shirofugen“ Amarelka chvalkovická 2/15a*	29. 5. 2013
H 52	Holovousy	“Shiro plum“ Amarelka chvalkovická 2/15 - 4*	29. 5. 2013
H 53	Holovousy	“Shiro plum“ Amarelka chvalkovická 2/15*	29. 5. 2013
H 54	Holovousy	“Kwanzan“ Amarelka chvalkovická 2/15*	29. 5. 2013
H 55	Holovousy	<i>P. avium</i> “Rusalka“ (strom 16/22)	29. 5. 2013
H 56	Holovousy	<i>P. avium</i> “Trušenskaja“ (strom 19/5)	29. 5. 2013
H 57	Holovousy	<i>P. avium</i> “Rekord“ (strom 19/13)	29. 5. 2013
H 58	Holovousy	<i>P. avium</i> “Konservnaja“ (strom 6/12)	29. 5. 2013
H 59	Holovousy	<i>P. avium</i> “Trušenskaja“ (strom 19/13)	29. 5. 2013
H 60	Holovousy	<i>P. avium</i> “Valerij Tschkalov“ (strom 4/25)	29. 5. 2013
H 61	Holovousy	<i>P. avium</i> “Skorospielka“ (strom 2/1)	29. 5. 2013
H 62	Holovousy	<i>P. avium</i> “Kišiněvskaja“ (strom 1/2)	29. 5. 2013
H 63	Holovousy	<i>P. cerasus</i> “Severjanka“ (strom 2/23)	29. 5. 2013
H 64	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/15a)	29. 5. 2013
H 65	Holovousy	<i>P. cerasus</i> “Anabolskaja“ (strom 5/18)	29. 5. 2013
H 66	Holovousy	<i>P. avium</i> “Dněprovka“ (strom 6/20)	29. 5. 2013
H 67	Holovousy	<i>P. avium</i> “Kitajevskaja“ (strom 10/9)	29. 5. 2013
H 68	Holovousy	<i>P. cerasus</i> “Ljubskaja“ (strom 8/1)	29. 5. 2013
H 69	Holovousy	<i>P. cerasus</i> “Žukovskaja“ (strom 3/26a)	29. 5. 2013
H 70	Holovousy	Genofond II (Strom č. 24/18)	29. 5. 2013
H 71	Holovousy	<i>P. avium</i> “Hruškoplodá“ (strom 4/28)	29. 5. 2013
H 72	Holovousy	<i>P. avium</i> “Ijunsckaja Ranaja“ (strom 5/8)	29. 5. 2013
H 73	Holovousy	<i>P. avium</i> “Děkanka“ (strom 15/5)	29. 5. 2013
H 74	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/16)	29. 5. 2013

Vzorek	Lokalita	Druh stromu	Datum sběru
H 75	Holovousy	<i>P. cerasus</i> "Erdi Krupnoplodnaja" (strom 2/9a)	29. 5. 2013
H 76	Holovousy	<i>P. avium</i> "Bigaro Oratovského" (strom 20/9)	29. 5. 2013
H 77	Holovousy	Genofond I (strom 17/19)	29. 5. 2013
H 78	Holovousy	<i>P. avium</i> "Grollova" (strom 7/13)	29. 5. 2013
H 79	Holovousy	<i>P. cerasus</i> "Rannaja II" (strom 1/1)	29. 5. 2013
H 80	Holovousy	<i>P. cerasus</i> „Grollova“ (strom 7/13)	29. 5. 2013
H 81	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/15)	29. 5. 2013
H 82	Holovousy	Amarelka chvalkovická (strom 2/15 – 4)	29. 5. 2013
H 83	Holovousy	"GF 305" Amarelka chvalkovická (strom 2/15 – 3)*	29. 5. 2013
K 91	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 92	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 94	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 95	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 100	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 102	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 106	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 108	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 109	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 110	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 111	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
K 112	Malý Kosíř	<i>Prunus avium</i>	9. 9. 2014
P 151	Podyjí	<i>Prunus mahaleb</i>	19. 9. 2014
P 157	Podyjí	<i>Prunus mahaleb</i>	19. 9. 2014
P 163	Podyjí	<i>Prunus mahaleb</i>	19. 9. 2014

Vzorek	Lokalita	Druh stromu	Datum sběru
P 166	Podyjí	<i>Prunus mahaleb</i>	19. 9. 2014
P 166	Podyjí	<i>Prunus mahaleb</i>	19. 9. 2014
P 167	Podyjí	<i>Prunus fruticosa</i>	19. 9. 2014
P 168	Podyjí	<i>Prunus fruticosa</i>	19. 9. 2014
P 169	Podyjí	<i>Prunus fruticosa</i>	19. 9. 2014
P 170	Podyjí	<i>Prunus fruticosa</i>	19. 9. 2014
P 171	Podyjí	<i>Prunus fruticosa</i>	19. 9. 2014
P 173	Podyjí	<i>Prunus avium</i>	19. 9. 2014
P 175	Podyjí	<i>Prunus avium</i>	19. 9. 2014
P 176	Podyjí	<i>Prunus avium</i>	19. 9. 2014

Pozn.: symbol * znamená, že jedná o testy na dřevitých indikátorech: "Bing", "Sam", "Canindex" – *P. avium*; "Kwanzan", "Shirofugen" – *P. serrulata*; "GF 305" - semenáče *P. Persica*; "Shiro plum" – *P. salicina*

10.2. Přehled použitých primerů

Tab. 3: Sekvence primerů pro 1. krok PDO nested RT-PCR

Název primeru	Sekvence	Velikost PCR produktu (bp)
Primer 1 – PDOF1i	TITTYATKAARWSICARYWITGIAC	446/631
Primer 2 – PDOR3i	GCRCACATRTCRTCICCGCRAAIIA	446/631
Primer 3 – PDOR4i	ARIYICCATCCRCARAAMITIGG	446/631

F = „Forward“ primer (5'-3'), R = „Reverse“ primer (3'-5')

Tab. 4: Sekvence primerů pro 2. krok PDO nested RT-PCR s primery PDOF2i/PDOR1i

Název primeru	Sekvence	Velikost PCR produktu (bp)
F primer – PDOF2i	GCYAARGCIGGICARACIYTKGCITG	362
R primer – PDOR1i	TCHCCWGTRAAICKSATIAIIGC	362

F = „Forward“ primer (5'-3'), R = „Reverse“ primer (3'-5')

Tab. 5: Sekvence primerů použitých pro PCR s primery NT3/NT1

Název primeru	Sekvence	Velikost PCR produktu (bp)
F primer – NT3	ATKATTTTYTCATCCCABCCY	218
R primer – NT1	ARATACTYTCMARYTGTCTRC	218

F = „Forward“ primer (5'-3'), R = „Reverse“ primer (3'-5')

10.3. Výskyt virů infikujících třešně a višně v České republice

Prof. Ing. Josef Špak, DrSc., Ing. Jaroslava Příbylová, PhD., Dr. Ing. Jana Fránová, Mgr. Ondřej Lenz, PhD., Mgr. Igor Koloniuk, PhD., RNDr. Vlastimila Špaková, Biologické centrum AV ČR v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc., RNDr. Dana Šafářová, PhD., Kateřina Hradilová, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého 771 47 Olomouc

Ing. František Paprštejn, CSc., Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy 1, 508 01 Hořice

Souhrn

V letech 2013-2014 jsme provedli monitoring výskytu virů třešňi a višňi v České republice, v produkčních výsadbách, genofondu i na planě rostoucích stromech. Sledovali jsme shodu mezi příznaky onemocnění a výskytem virů. Molekulárně-biologickým testem polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) jsme prokázali výskyt *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Little cherry virus 1* (LChV1), *Cherry virus A* (CVA), *Cherry leaf roll virus* (CLRV) a *Apple mosaic virus* (ApMV) a získali i částečné sekvence těchto virů. Výsledky ukázaly zásadní rozdíly ve výskytu virů ve výsadbách, v planých stromech a v genofondu. Ve výsadbách jsou četné zejména infekce PNRSV a PDV, v genofondu je počet druhů vyšší. Přenosem na bylinné indikátorové rostliny byly pro další studium získány izoláty CLRV a PNRSV.

Summary

A monitoring on the occurrence of cherry and sour cherry viruses in orchards, on wild trees and germplasm collection at the Research and Breeding Institute of Pomology Ltd. Holovousy was conducted in 2013-2014. The correlation between symptoms and virus infections in trees was evaluated. *Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Little cherry virus 1* (LChV1), *Cherry virus A* (CVA), *Cherry leaf roll virus* (CLRV) and *Apple mosaic virus* (ApMV) were detected by the reverse transcription -polymerase chain reaction (RT-PCR) and partial sequences were obtained. We found reasonable differences in the occurrence of viruses in orchards, wild trees and in the germplasm. PNRSV and PDV infections were the most frequent in orchards while in germplasm collection the number of virus species was higher. Isolates of CLRV and PNRSV were obtained by mechanical inoculation onto herbaceous indicator plants.

Úvod

Třešně a višně mohou být celosvětově napadeny až 22 různými viry (Hadidi et al., 2011). V České republice jich dosud bylo spolehlivě prokázáno pouze 7: *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV), *Cherry virus A* (CVA), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) a *Little cherry virus 1* (LChV1).

K zjištění jejich přítomnosti byly použity dvě metody: ELISA a RT-PCR (polymerázová řetězová reakce po přepisu virové RNA). Pomocí ELISA testů byla zjištěna přítomnost pouze tří virů: PNRSV, PDV a ACLSV. Modernější metoda RT-PCR umožnila identifikovat všech sedm výše uvedených virů.

PNRSV byl detekovaný v třešních a višních pomocí ELISA testu a RT-PCR (Karešová et al., 1986; Paprštejn et al., 1995; Suchá a Svobodová, 2010). PDV byl detekován na třešních (Suchá a Svobodová, 2010) a višních (Suchá 2014) pomocí testů ELISA a RT-PCR. PPV infikující třešně byl zjištěn pomocí RT-PCR (Navrátil et al., 2004; 2008). CVA byl detekován na třešních a višních pomocí RT-PCR. Pomocí ELISA testu byl na třešních prokázán ACLSV (Karešová a Paprštejn, 2001). Ačkoliv pro správnou identifikaci viru je nutné znát i konkrétní sekvenci jeho genomu, toto bylo dosud provedeno jen v případě čtyř virů. U PNRSV a PDV byla získána sekvence kapsidového proteinu a byla zjištěna jejich variabilita v ČR i ve světě (Vašková et al., 2000a; Vašková et al., 2000b). Částečné sekvence byly získány i u ApMV (Lenz, 2001) a CVA (Grimová et al., 2010). Komplexnější porovnání virových izolátů z ČR a ze světa tak stále chybí.

Ludvíková a Suchá (2011), Ludvíková et al. (2011) a Chroboková et al. (2012) prokázaly v ČR výskyt onemocnění maloplodosti třešni (LChD). Neuvádí však, jaký virus byl v PCR pozitivních stromech přítomen, zda *Little cherry virus 1* (LChV 1) nebo *Little cherry virus 2* (LChV 2). Na základě sekvence zveřejněné v databázi GenBank (podle níž byly zřejmě navrženy primery, které autorky pro detekci LChD z literatury převzaly) lze pouze usuzovat, že detekovaly LChV1.

V literatuře existuje i řada dřívějších prací, popisujících příznaky virových onemocnění třešni a višni v ČR (např. Janečková a Blatný, 1980; Zimandl et al., 1975). Nicméně ověření jejich původců nebo výskytu je problematické.

Je možné, že v třešních a višních v ČR se vyskytuje daleko více druhů virů, než bylo dosud uváděno. Některé z nich mohou patřit i k těm, jejichž výskyt se např. v genofondech dosud nesledoval. Cílem naší práce byl proto první komplexní průzkum výskytu virů třešni a višni v ČR s využitím metody RT-PCR a sekvenování, sledování shody mezi příznaky onemocnění a výskytem virů a mechanický přenos izolátů virů na bylinné indikátorové rostliny pro účely dalšího detailního studia.

Materiál a metodika

V letech 2013 a 2014 jsme provedli monitorování výskytu virů na třešních a višních v ČR. Celkem 121 vzorků listů bylo odebráno přednostně ze stromů se specifickými příznaky virové infekce, dále s nespecifickými příznaky i z bezpříznakových stromů. Vzorky jsme odebírali v sadech na 14 lokalitách v okolí Lhenic, Boršova a Lipí u Č. Budějovic (celkem 45 stromů) a v genofondu VŠÚO Holovousy s.r.o. (76 stromů). Odběr jsme provedli i z 12 planě rostoucích stromů třešni ve Lhenicích a na Moravě (lokality Malý Kosíř, okr. Olomouc - 12 stromů třešně ptačí (*Cerasus avium*), Popice - Podyjí - 3 stromů třešně ptačí, Znojmo - Hradištské terasy - 4 stromy *Prunus mahaleb*, Havraníky - 5 stromů *Prunus fruticosa*). Odběr probíhal v období od dubna až do srpna.

Izolace nukleových kyselin a RT-PCR

Z listů stromů byla izolována dsRNA dle modifikovaných metod Morris a Dodds, 1979; Valverde et al., 1985. Z některých vzorků byla rovněž izolována celková RNA (dle standardního protokolu RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany). Vzorky byly testovány pomocí RT-PCR publikovanými nebo nově navrženými primery na detekci ApMV, PNRSV, PPV, PDV, *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), ACLSV, *Little cherry virus 1 a 2* (LChV1, 2), *Cherry mottle leaf virus* (CMLV), CVA, *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *American plum line pattern virus* (APLPV) a rodově specifickými primery pro como, clostero, potex, poty a tymoviry. Detekce virů byla prováděna pomocí RT-PCR metody a získané PCR produkty byly sekvenovány klasickou Sangerovou metodou.

Přenos vybraných izolátů virů na indikátorové rostliny

Pomocí mechanické inokulace diferenčních hostitelských rostlin byly testovány listy odebrané z 20 stromů třešní z lokality Lhenice, 1 planě rostoucího stromu třešně z Boršova nad Vltavou a z 56 stromů třešní a višňů z Holovous. Pro mechanickou inokulaci byly použity následující indikátorové rostliny: *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis* 37B, *Nicotiana obliqua* P1, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris* a *Physalis floridana*. Celkem bylo inokulováno cca 3000 indikátorových rostlin.

Výsledky a diskuse

Přednostně byly odebírány mladé listy ze stromů vykazujících příznaky virové infekce (mozaiky, kresby, kroužky, nekrózy, změny zbarvení, velikosti a tvaru listů a květů). Výsledky ukázaly, že v 63 vzorcích odebraných ze stromů třešní s příznaky byl prokázán některý z virů ve 36 případech (57%), u višňů bylo z 23 vzorků pozitivních 14 (61%). Naproti tomu u 23 vzorků ze stromů třešní bez zjevných příznaků byla prokázána infekce viry ve 13 případech (56,5%), u 12 višňů v 10 případech (83%). Je tedy zřejmé, že příznaky je v případě infekcí virů třešní a višňů možné brát pouze jako orientační ukazatel zdravotního stavu. Vzorky listů byly odebírány během poměrně dlouhého období od dubna až do konce srpna. Vzhledem k tomu, že projevy na listech se během roku mění, při výběru vzorků na ně nelze spoléhat. Již dříve popsané specifické příznaky pro jednotlivé viry nebyly příliš typické, proto jsme odebírali i vzorky z bezpříznakových listů. To se ukázalo jako správné, citlivá metoda RT-PCR zachytí i nízké množství viru přítomného ve zdánlivě zdravém stromě. Příznaky na listech se mohou lišit podle druhu i odrůdy, takže u některých druhů i odrůd se mohou vyskytovat pouze latentně, bez viditelných příznaků.

Detekce virů v ovocných stromech patří k velmi obtížným, proto jsme využili pouze citlivější RT-PCR s následným sekvenováním získaných produktů, které jednoznačně identifikuje prokázaný virus. Právě použití molekulárně biologických metod vedlo v posledním desetiletí k výraznému pokroku při detekci virů včetně popisů nových virů a jejich izolátů. Přehled zjištěných virů, primerů použitých pro detekci virů metodou PCR a získaných sekvencí je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Zjištěné viry a primery použité pro detekci virů metodou RT-PCR

Virus	Pozitivní vzorky	Sekvence	Název a sekvence primerů	Citace
PNRSV	17	4	PNRSV2: GCC GAA TTT GCA ATC ATA CC	Lenz et al., 2008
			PNRSV2r: GGG GCA TCC ACA ACT TCA C	
PDV	6	4	PDV1: CGA TTG GTT AAC TCA CTT TG	Lenz et al., 2008
			70E5: AGC AGC ATT TCC AAC TAC GA	
ACLSV	2	1	ACLSV2: TAA ACA GCA CCT CTG AGA TG	Lenz, nepublikováno
			ACLSV2r: GTT CCT TTT CCA CCA TAC TG	
LChV1	4	1	LCV1U16390: TCC GCC TGA AGC ACC TAA TCC A	Rott a Jelkmann, 2001
			LCV1L16809: GGT AAG CGG TAT AAA ACC CTC CTC T	
CVA	23	5	CVA7097U: GCT TAA CTG CCA GAG CAA TTA A	Isogai et al., 2004
			CVA7383L: AAG GAA AAA GAA TAA AAA GTC CTA	
CLRV	4	4	CLRVi1: GTT AAC GAA TAT CTA CTG C	Bertolini et al., 2003
			CLRVi2: CAA ATA TTG CTA AAC AAC C	
ApMV	2	2	108N7: TCG TGA AGA AGT TTA GGT TGG	Lenz, 2001
			87E6: ATG CTT TAG TTT CCT CTC GG	

RT-PCR a sekvenováním jsme potvrdili přítomnost všech dosud popsaných virů ve stromech třešňí a višňí v ČR, s výjimkou viru šarky švestky (PPV). Skutečnost, že v žádném z testovaných stromů třešňí a višňí v sadech či planých třešňích PPV nebyl detekován, je pro ovocnáře dobrá zpráva. Dříve zjištěný výskyt PPV v třešňích pouze v několika stromech v genofondu VŠÚO (Navrátil et al., 2004, 2008) tedy zůstává na území ČR ojedinělým.

ACLSV (Karešová a Paprštejn, 2001) jsme potvrdili sekvenováním. Podobně jsme získali první sekvenční LChV1 z území ČR a upřesnili jsme tak znalost o možném původci onemocnění maloplodosti třešňí LChD v našich klimatických podmínkách. CLRV byl v třešňích sérologicky prokázán Novákem a Lanzovou (1974) a později byly symptomy a mechanický přenos popsány Albrechtovou a Chodem (1981). Naše nálezy CLRV celkem ve 4 vzorcích (z toho v 1 vzorku třešně na Českobudějovicku a 3 vzorcích z višňí v Holovousích) a částečné sekvenční viru podstatně rozšiřují naše znalosti a umožňují porovnat sekvenční se zahraničními izoláty viru.

Naše výsledky ukázaly zásadní rozdíly ve výskytu virů ve výsadbách, v planých stromech a v genofondu, které dokumentuje tabulka 2.

Tabulka 2 Výsledky testování stromů ve Lhenicích a Holovousích

Lhenice		Genofond Holovousy	
třešně	višně	třešně	višně
1 PDV	1 PNRSV	1 CVA	1 PNRSV + CVA
2 PDV	2 PNRSV	2 LChV1, CVA	2 PNRSV + CVA
3 PDV	3 PNRSV	3 CVA	3 CVA + CLRV
4 PDV	4 PDV PNRSV,	4 PNRSV	4 PNRSV
5 PDV	5 PDV	5 CVA	5 PNRSV
6 PDV		6 PNRSV, CVA	6 CLRV + PNRSV
7 PDV		7 PNRSV, CVA	7 PNRSV + PDV
8 PDV		8 PNRSV	8 CVA
9 PDV		9 CVA	9 PNRSV + CVA
10 PDV		10 CVA	10 PNRSV + CVA
11 PDV		11 PNRSV, CVA	11 PNRSV
12 PDV		12 PNRSV, CVA	12 PNRSV + PDV
13 PDV		13 CVA	13 CVA
14 PDV		14 PNRSV, CVA	14 CVA CLRV + PNRSV + LChV1 +
15 PNRSV		16 PNRSV	15 CVA
16 CVA		17 LChV1	
plané třešně		18 PNRSV	
1 PDV, LChV1		19 PNRSV, ACLSV PDV, ACLSV, CVA,	
2 PDV		20 CLRV	
3 PDV		21 CVA	
4 PDV		22 CVA	
5 PDV		23 CVA	
6 PDV		24 LChV1, CVA	
7 PDV		26 ACLSV, CVA	

Ve výsadbách třešní na Lhenicku a Českobudějovicku jsme zjistili četný výskyt PDV, zatímco PNRSV, CVA, LChV1 a CLRV byl prokázán pouze ojediněle. Obdobné výsledky publikoval Polák (2007), který imunoenzymatickým testem ELISA testoval 55 stromů třešní a višni. PPV nezjistil, PDV prokázal ve 14 stromech třešní (25%), PNRSV ve 12 stromech (22%) a CLRV v 1 stromě (1,8%). Ve výsadbách višni jsme prokázali vyšší výskyt PNRSV než PDV, což je v souladu s nejnovějšími údaji o přítomnosti těchto virů ve výsadbách višni odrůd Újfehértói fürtos a Fanal v ČR (Suchá, 2014) i s výsledky rozsáhlého ELISA testování višni a třešní na přítomnost PDV a PNRSV v letech 2006-2008 (Suchá a Svobodová 2010).

V genofondu třešní VŠÚO Holovousy jsme zjistili CVA, PNRSV, PDV, LChV1, CLRV a ACLSV, v genofondu višni CVA, PNRSV, PDV, LChV1, CLRV. V některých stromech třešní a višni jsme zjistili i směsné infekce 2 virů, v jednom případě i 3 respektive 4 virů. Zajímavé je, že ve velkém počtu stromů byl zjištěn CVA (celkem ve 27 vzorcích třešní a višni). Tento virus však nevytváří výrazné příznaky na infikovaných stromech a zřejmě nepůsobí významnější ekonomické ztráty, ale v kombinaci s dalšími viry může ovlivnit intenzitu příznaků nebo inkompatibilitu při roubování (James a Jelkmann, 1998).

Výsledky ukázaly, že genofondy jsou nedocenitelné nejen pro zachování genetické rozmanitosti odrůd. Přirozené směsné infekce virů ve stromech, které umělou inokulací prakticky nelze připravit, jsou unikátním materiálem pro studium virů, jejich variability a vzájemných interakcí. Je třeba zdůraznit, že některé viry byly popsány v posledních letech. Jejich detekce nebyla před nástupem molekulárních diagnostických metod možná a certifikace zdravotního stavu stromů proto odpovídala tehdejší znalostem a metodám. Vyšší výskyt i četnost druhů virů v genofondu, založeném ing. Paprštejnem v letech 1988-1989, lze vysvětlit tím, že genofondy představují mnohaleté sbírky odrůd získaných z nejrůznějších stádů, kde byly dlouhodobě udržovány.

V planě rostoucích třešních na Lhenicku jsme zjistili 6 stromů pozitivních na PDV, a 1 strom na PDV + LCHV1 (tabulka 2). Ve stromech třešně ptačí (*Cerasus avium*), mahalebky obecné (*Prunus mahaleb*) a třešně křovité (*Prunus fruticosa*) přirozeně se vyskytující na lokalitách střední a jižní Moravy se překvapivě nepodařilo prokázat žádný z virů. Tyto druhy jsme testovali s cílem zjistit výskyt virů na planě rostoucích stromech mimo produkční výsadby. Navíc *Prunus mahaleb* jsme testovali z důvodu jejich využití jako podnože pro třešně a višně.

Při hodnocení ekonomického a epidemiologického významu výskytu virů třešně a višně na území ČR je tedy třeba odlišovat planě rostoucí stromy a původní botanické druhy na přirozených stanovištích, kulturní výsadby a genofondy. Přitom při podrobném studiu literatury o virech zjištěných v ČR není možné údaje, zda testované stromy pocházely ze sadů, planých stromů nebo genofondu, v řadě případů dohledat např. Polák J. (2007).

Přenos vybraných izolátů virů na bylinné indikátorové rostliny

Přes vysoký počet inokulovaných indikátorových rostlin se podařilo přenést viry jen ve dvou případech. Z třešně č. 11 z genofondu VŠÚO Holovousy se nejprve podařil přenos PNRSV pouze na jednu rostlinu *Chenopodium quinoa* z deseti inokulovaných. Z této rostliny byl již v 90% úspěšný přenos na další indikátory (*Ch. quinoa*, *Cucumis sativus* a *Phaseolus vulgaris*). Přímý přenos z listů třešně na jiné indikátory než *Ch. quinoa* úspěšný nebyl. Identifikaci viru PNRSV pomocí RT-PCR jsme následně potvrdili sekvenováním RNA izolované z indikátorů i z původního stromu.

Mechanickou inokulací extraktu z listů stromu č. 43 (třešeň Holovousy) se podařilo přenést virovou infekci na rostliny tabáku (*N. occ. 37B* a *N. obliqua* P1) a merlíku (*Ch. quinoa*). Na listech *N. occ. 37B* vznikaly výrazné lokální nekrotické léze (LNL) i kroužky a později síťová mozaika v systému. Při použití šťávy z listů se systémovou síťovou mozaikou byl následný přenos na další rostliny tabáku úspěšný, při použití listů s LNL se přenos na tabák či jiné indikátory opakovaně nezdařil. Ze symptomatických rostlin *N. occ. 37B* byly infikovány i rostliny *Phaseolus vulgaris*. Přenos viru z listů třešně na indikátorové rostliny byl úspěšný pouze z čerstvých nebo zamražených listů, které byly odebrány ze stromů na jaře a na počátku léta. Pomocí RT-PCR a sekvenování byl v indikátorových rostlinách prokázán CLRV. Identickými metodami byla v původním stromu zjištěna směsná infekce 4 virů – CLRV, PDV, ACLSV a CVA. Výsledky potvrzují obtížnost získání a udržování izolátů virů infikujících třešně a višně pouze pomocí mechanické inokulace rostlin. Izoláty CLRV a PNRSV slouží jako pozitivní kontroly a budou využity pro další studium.

Zjištěné viry se přenášejí ve většině případů vegetativní cestou, roubováním a necertifikovaným kontaminovaným sadbovým materiálem. Některé viry, jako například CLRV, PDV a PNRSV se šíří rovněž pylem (Rebenstorf et al., 2006; Digiaro a Savino, 1992).

Na šíření virových infekcí se z velké části podílí i člověk, který ovlivňuje zejména pohyb infikovaných rostlin. Zdrojem infekce mohou být také planě rostoucí stromy a keře (Polák J. (2007). Preventivní opatření, která spočívají zejména v používání zdravé sadby a likvidace zdrojů nákazy, jsou proto hlavními a nezbytnými způsoby zabránění šíření infekce.

Závěr

Naše studie je prvním průzkumem výskytu dosud popsaných 22 virů třešňi a višňi v ČR, který byl proveden pomocí RT-PCR a ověřen následným sekvenováním získaných produktů. Dokládá významné rozdíly ve výskytu virů a zejména jejich směsných infekcí v sadech, genofondu a planých třešních. Ukazuje, že zejména v případě popisu nových virů nebo výskytu virů, jejichž výskyt na třešních a višních v ČR nebyl dosud sledován, je vhodné ověření původu testovaných stromů. Vedle zjištění výskytu virů, považujeme za přínos práce ověření primerů pro citlivou detekci virů ve vzorcích ze stromů. Ty je možné využít k testování rozmnožovacích materiálů třešňi a višňi a přispět k získání kvalitní bezvirové sadby a zlepšení zdravotního stavu výsadeb v ČR.

Článek byl odborně recenzován.

Výsledky tohoto výzkumu byly získány při řešení grantu LD 14004 MŠMT, s podporou na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace RVO:60077344 a pomocí infrastruktury programu CZ.1.05/2.1.00/03.0116.

Seznam použité literatury je k dispozici u autorů nebo v redakci časopisu.

Literatura

Albrechtová L., Chod J. (1981): Identification of viruses in sweet cherry trees (*Prunus avium* L.) with symptoms similar to cherry leaf roll. In: Plant Virology. Proceedings 9th Conference Czechoslovak Plant Virologists, Brno, s. 17–20.

Bertolini E., Olmos A., López M. M., Cambra M. (2003): Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, 93, s. 286-292.

Digiario M., Savino V. (1992): Role of pollen and seeds in the spread of ilarviruses in almond. *Advances in Horticultural Science*, 6, No. 3, s. 134-136.

Grimová L., Zouhar M., Ryšánek P., Drabešová J., Mazáková J., Paprštejn F. (2010): First occurrence of *Cherry virus A* (CVA) in the Czech Republic. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius-Kühn-Archiv*, 427, s. 275-277.

Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (2011): Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits, *The American Phytopathological Society Press*, St Paul, MN, USA, 429 s.

Chroboková E., Suchá J., Ludvíková H. (2012): Výskyt a detekce virového onemocnění maloplodosti třešně (LChD) v České republice. *Zahradnictví*, č. 4, s. 10-12.

- 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, s. 288-291.
- James D., Jelkmann W. (1998): Detection of Cherry virus A in Canada and Germany. *Acta Horticulturae*, 472, s. 299-304.
- Janečková M., Blatný C. (1980): Termoterapie višně odrůdy 'Fanal' onemocnělé zelenokroužkovou strakatostí. *Sborník ÚVTIZ - Ochrana Rostlin*, roč. 16, č. 3, s. 161-164.
- Karešová R., Navrátil M., Pluhař Z., Paprštejn F. (1986): První výsledky testu ELISA na přítomnost viru nekrotické kroužkovitosti (*Prunus necrotic ringspot virus*) třešní, višňů a slivoní. *Sborník ÚVTIZ – Zahradnictví*, roč. 13, č. 3, s. 169-176.
- Karešová R., Paprštejn F. (2001): *Apple chlorotic leaf spot virus* in germplasm collection of fruit species. *Acta Horticulturae*, 550, s. 259-264.
- Lenz O. (2001): Molekulární detekce viru mozaiky jabloně v planých i kulturních hostitelích. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 25s.
- Lenz O., Petrzik K., Špak J. (2008): Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses. *Journal of Virological Methods*, 148, s. 96-105.
- Ludvíková H., Suchá J. (2011): First report of Little cherry disease from sweet cherry (*Prunus avium*) and sour cherry (*P. cerasus*) in the Czech Republic. *Plant Disease*, vol. 95, No. 9, s. 1197
- Ludvíková H., Suchá J., Křivohlávková L., Jelkmann W. (2011): Diagnostika maloplodosti třešně (Little cherry disease – LChD). *Vědecké práce ovocnářské*, č. 22, s. 129-133.
- Morris T. J., Dodds J. A. (1979): Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, vol. 69, s. 854-858.
- Navrátil M., Šafářová D., Crescenzi A., Fanigliulo A., Comes S., Petrzik K., Karešová R. (2004): The occurrence of PPV in cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 657, s. 237-244.
- Navrátil M., Šafářová D., Gadiou S., Fránová J., Kučerová J., Taláčko L. (2008): The partial molecular characterization of *Plum pox virus* infecting sweet cherry trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 781, s. 203-208.
- Novák J. B., Lanzová J. (1974): Sérologická identifikace viru svinutky třešně na některých dřevinách v Československu. In: Sbor. Vysoké školy zemědělské, Praha, Řada A: 205–223.
- Paprštejn F., Karešová R., Blažek J. (1995): Dynamics of dissemination of *Prunus necrotic ringspot* in virus germplasm collection of cherries. *Acta Horticulturae*, 385, s. 176-182.
- 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, s. 1–4.
- Rebenstorf K., Candresse T., Dulucq M. J., Büttner C., Obermeier, C. (2006): Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry Leaf Roll Virus*. *Journal of Virology*, vol. 80, no. 5, s. 2453-2462.

- Rott M. E., Jelkmann W. (2001): Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*, 91, s. 261-267.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. 1985. A novel method for the prenatal diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Amer. Soc. Human Genetics*.
- Suchá J. (2014): Nové poznatky o projevu infekce viru *Prunus necrotic ring spot virus* na višních. *Zahradnictví*, č. 12, s. 6-7.
- 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. *Horticultural Science* (Prague), vol. 37, s. 118-120.
- 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*, s. 459-465.
- Vašková D., Petrzik K., Karešová R. (2000a): Variability and molecular typing of the woody-tree infecting prunus necrotic ringspot ilarvirus. *Archives of Virology*, 145, s. 699-709.
- Vašková D., Petrzik K., Špak J. (2000b): Molecular variability of the capsid protein of the prune dwarf virus. *European Journal of Plant Pathology*, 106, s. 573-580.
- Zimandl B., Janečková M., Blatný C. (1975): Latentní výskyt viru zelenokroužkové strakatosti ve třešních, višních a broskvoních v ČSSR. *Sborník ÚVTIZ - Ochrana Rostlin*, roč. 11, č. 3, s. 179-184.