

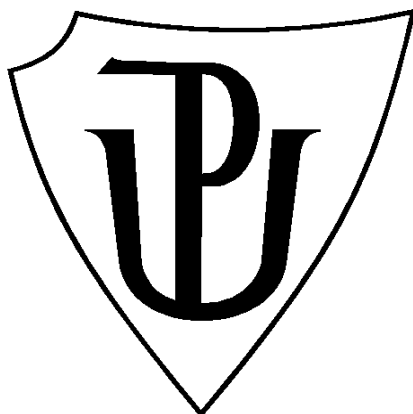
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Pavel Dostalík**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Molekulární charakteristika a rekombinační  
analýza genomu *Apple chlorotic leaf spot virus***

**Bakalářská práce**

**Pavel Dostálík**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017      Vedoucí práce: prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. Veškeré zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne.....

---

Pavel Dostálík

## SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá molekulární a genetickou variabilitou a fylogenetickou příbuzností izolátů viru chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV).

V teoretické části je popsáno taxonomické zařazení ACLSV spolu s charakterizací čeledi *Betaflexiviridae* a rodu *Trichovirus*. Zmíněny jsou struktura a složení virové částice ACLSV a biologické vlastnosti viru. Popsána je také virová RNA ACLSV a dalších virových druhů řadících se k rodu *Trichovirus* včetně charakterizace vlastností a funkcí jednotlivých virových proteinů a syntézy virové RNA ACLSV. Jsou charakterizovány variabilní a konzervované oblasti genomu, které byly zjištěny v jednotlivých čtecích rámcích ACLSV a dalších příbuzných druhů. Zmíněna je variabilita a okruh hostitelů zástupců rodu *Trichovirus*. Uvedena je řada států, kde byl zaznamenán výskyt ACLSV, dále jsou zmíněny příznaky infekce ACLSV na hostitelských druzích. V teoretické části jsou popsány metody detekce ACLSV a také ozdravování rostlin.

V experimentální části byly získány sekvence jednotlivých čtecích rámců izolátu ACLSV 154 získaného ze stromu *Prunus domestica*. Dílčí nukleotidové sekvence ORF1, ORF2 a ORF3 byly dlouhé 3663 nt, 1288 nt, a 288 nt. Tyto sekvence vykazovaly nejvyšší procentuální identitu 81 % - 86 % se sekvencemi izolátů ACLSV B6, P863, GC10a a Be. Izolát se pravděpodobně řadí do klastru B6. Analýza v programu BLAST a fylogenetická analýza částí nukleotidových i aminokyselinových sekvencí jednotlivých čtecích rámců potvrdily vysokou variabilitu mezi sekvencemi izolátů ACLSV z různých zemí světa. Rekombinační analýza byla provedena mezi sekvencemi nukleotidů těchto izolátů.

## SUMMARY

The bachelor thesis deals with the molecular and genetic variability and phylogenetic relation of individual isolates of the *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV).

The theoretical part describes the taxonomic classification of ACLSV and characterization of the family *Betaflexiviridae* and genus *Trichovirus*. There are also mentioned structure and composition of the viral particles of ACLSV and viral biological properties. The viral RNA of ACLSV and other viral strains belonging to the genus *Trichovirus* is described including the characterization of properties and functions of individual virus proteins and the synthesis of the ACLSV viral RNA. The theoretical part also contains characteristics of variable and conserved regions of the genome which are identified in the individual reading frames of ACLSV and other related species. There is also information about variability and host range of viruses from genus *Trichovirus*. Many countries where the occurrence of ACLSV has been reported are provided in the theoretical part of this thesis. The symptoms of ACLSV infection in host species are mentioned below. In the theoretical part, there are description of methods of detecting ACLSV and plant healing.

In the experimental part was obtained sequences of individual ORFs of ACLSV 154 isolate obtained from a tree of *Prunus domestica*. The length of the partial nucleotide sequences of ORF1, ORF2 and ORF3 was 3663 nt, 1288 nt, 288 nt. These sequences exhibited the highest percent identity 81 % - 86 % with sequences of ACLSV isolates B6, P863, GC10a and Be. The Isolate probably belongs to the B6 cluster. Analysis by BLAST and phylogenetic analysis of parts of the nucleotide and amino acid sequences of individual reading frames confirmed the high variability between sequences of ACLSV isolates from different countries of the World. The recombination analysis was provided with nucleotide sequences of ACLSV isolates.

**Poděkování:**

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc., za odborné vedení, připomínky a množství věnovaného času v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat pracovníkům z Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, zvláště paní laborantce Janě Veselské. Moje poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich psychickou podporu. Práce byly financovány Interní grantovou agenturou Univerzity Palackého IGA\_PrF\_2016\_003.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	10
3	Seznam zkratk .....	11
4	Současný stav studované problematiky.....	12
4.1	<i>Trichovirus</i> .....	12
4.1.1	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> .....	13
5	Charakteristika genomu ACLSV a některých dalších členů rodu <i>Trichovirus</i> .....	14
5.1	Charakteristika jednotlivých čtecích rámců ACLSV .....	15
5.2	Organizace genomu některých dalších zástupců rodu <i>Trichovirus</i> .....	18
5.3	Konzervované a variabilní oblasti ACLSV .....	20
5.3.1	Konzervované oblasti .....	20
5.3.2	Variabilní oblasti .....	20
5.3.3	Syntéza RNA molekul ACLSV .....	21
6	Molekulární variabilita ACLSV .....	22
6.1	Geografické rozšíření a genetická variabilita ACLSV .....	23
6.2	Genetická variabilita dalších zástupců rodu <i>Trichovirus</i> .....	23
7	Okruh hostitelů ACLSV .....	24
7.1	Okruh hostitelů dalších zástupců rodu <i>Trichovirus</i> .....	25
8	Příznaky chlorotické skvrnitosti listů jabloně na různých hostitelích .....	25
8.1	Geografické rozšíření ACLSV .....	26
8.2	Metody detekce viru.....	27
8.3	Ozdravování rostlin .....	27
9	Metodika.....	29
9.1	Biologický materiál .....	29
9.2	Izolace virové RNA.....	29
9.3	Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce .....	30
9.4	Elektroforéza .....	31
9.5	Klonování .....	31

9.6	Očkování agarových ploten.....	32
9.7	Test pozitivních kolonií, ověření úspěšnosti ligace a transformace .....	32
9.8	Izolace vzorků z gelu.....	33
9.9	Sevenační značení .....	33
9.10	Bioinformatická analýza .....	34
9.11	Pomůcky.....	35
9.12	Reagencie a biologický materiál .....	36
10	Výsledky.....	38
11	Diskuze.....	54
12	Závěr .....	58
13	Seznam literatury .....	59
13.1	Internetové zdroje.....	67



# 1 Úvod

Virová onemocnění rostlin jsou závažným problémem při pěstování kulturních plodin. Některé viry mohou být přenášeny pylem, semeny, hmyzími vektory nebo při roubování. Virové infekce mají vliv na úrodnost a kvalitu plodů napadených rostlin. V současné době jsou vypracovávány a zaváděny moderní metody detekce virových nukleových kyselin a proteinů, stejně jako metody ozdravování rostlin ať už pomocí chemoterapie, termoterapie nebo kombinací obou těchto metod. Rovněž jsou šlechtěny kultivary rostlin, které jsou rezistentní k virovým infekcím. Viry jsou rozšířeny po celém světě a často vykazují vysokou genetickou a biologickou variabilitu. Studium genetické a biologické variability má stejně jako studium způsobu šíření virů významnou roli v boji proti chorobám, které způsobují.

*Trichovirus* je rozmanitým virovým rodem, jehož zástupci mají významný vliv na kvalitu ovoce. Nejlépe prozkoumaným zástupcem tohoto rodu z hlediska molekulární biologie i biologických vlastností je *Apple chlorotic leaf spot virus*, některé další viry jako například *Phloem mottle virus* byly objeveny a zařazeny do rodu *Trichovirus* teprve relativně nedávno.

## 2 Cíle práce

- Vypracování rešerše na téma Genetická variabilita zástupců rodu *Trichovirus* a jejich hostitelská specifita.
- Zvládnutí použitých metod: izolace celkové RNA, RT - PCR, klonování, sekvenování, bioinformatika.
- Analýza získaných genomických sekvencí ACLSV a sekvencí dostupných v databázi NCBI s cílem nalézt možné genomické rekombinace a analyzovat vztah mezi genetickou variabilitou izolátů a jejich hostitelským okruhem.

### 3 Seznam zkratek

Acc. = přístupové číslo

ACLSV = *Apple chlorotic leaf spot virus*

AGCaV = *Apple green crinkle associated virus*

ak = aminokyselina

APCLSV = *Apricot pseudo - chlorotic leaf spot virus*

ApLV = *Apricot latent virus*

ASGV = *Apple stem grooving virus*

ASPV = *Apple stem pitting virus*

bp = pár bází

cDNA = komplementární DNA

CMLV = *Cherry mottle leaf virus*

DNA = deoxyribonukleotidová kyselina

dsRNA = dvouvláknová ribonukleová kyselina

EPPO = Evropská a středomořská organizace na ochranu rostlin

EU = Evropská unie

GINV = *Grapevine berry inner necrosis virus*

GPGV = *Grapevine Pinot gris virus*

kbp = 1000 párů bází

kDa = kilodalton

mRNA = messenger ribonukleová kyselina

nt = nukleotid

ORF = otevřený čtecí rámeček

PcMV = *Peach mosaic virus*

PCR = polymerázová řetězová reakce

PVT = *Potato virus T*

RdRp = RNA dependentní RNA polymeráza

RNA = ribonukleová kyselina

RT-PCR = reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce

SCCP = polymorfismus konformace jednovláknové DNA

ssRNA = jednovláknová ribonukleová kyselina

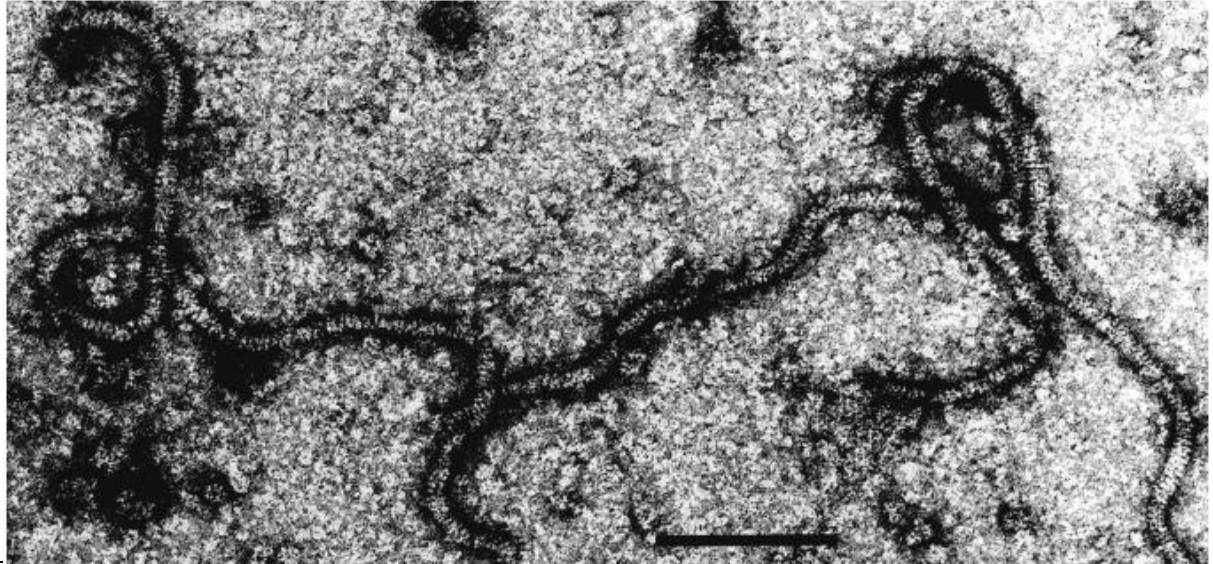
## 4 Současný stav studované problematiky

### 4.1 *Trichovirus*

*Trichovirus* je relativně mladým virovým rodem řadícím se k čeledi *Betaflexiviridae* a podčeledi *Trivirinae*. Do tohoto rodu se řadí celkem 7 virových druhů: *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, *Cherry mottle leaf virus*, *Grapevine berry inner necrosis virus*, *Grapevine Pinot gris virus*, *Peach mosaic virus*, *Phlomis mottle virus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Okruh hostitelských druhů může být široký jako v případě ACLSV, u ostatních zástupců rodu *Trichovirus* tak široký být nemusí, což je uvedeno v kapitole 7.1 Okruh hostitelů dalších zástupců rodu *Trichovirus*. Replikace viru se odehrává v cytoplazmě napadené buňky. Průměr flexibilní virové částice bývá 12 nm a délka v rozmezí 640 nm - 820 nm. Kapsida má helikální strukturu. Relativní molekulová hmotnost plášťového proteinu se pohybuje mezi 19,7 kDa - 27 kDa. Zástupci tohoto rodu mají malý genom o velikosti přibližně 7,5 kbp - 8,7 kbp a množství RNA odpovídá asi 5 % hmotnosti virové částice. Některé viry jako *Cherry mottle leaf virus* a *Peach mosaic virus* obsahují ve své nukleové kyselině další krátký čtecí rámeček za sekvencí pro plášťový protein. Viry tohoto rodu neobsahují lipidy ani sacharidy. Trichoviry jsou obecně podobné closterovirům (Martelli a kol. 1994; James a kol. 2000; Adams a kol. 2004; James a kol. 2006; Martelli a kol. 2007).

### 4.1.1 *Apple chlorotic leaf spot virus*

Obrázek 1: Virové částice ACLSV (Virus taxonomy 2012)



Na snímku z elektronového mikroskopu jsou viditelné vláknité částice viru ACLSV.

Virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně byl poprvé objeven u jabloně v roce 1959 ve Spojených státech amerických. Následně byl nalezen na jiných kontinentech i u dalších ovocných druhů z čeledi růžovitých (*Rosaceae*) např. u hrušně, švestky, meruňky nebo broskvoně. Jedná se o rostlinný virus vyskytující se prakticky po celém světě a míra jeho rozšíření závisí na výskytu hostitelských druhů. ACLSV je přenášen vegetativně, tedy spolu s částmi těl rostlin například při roubování, očkování a odnožování. Není znám žádný vektor, který by ACLSV přenášel a není možný ani přenos prostřednictvím pylu nebo semen (Yoshikawa a kol. 2001; Garcia-Ibarra a kol. 2010; Püpola a kol. 2011; Katsiani a kol. 2014; Malan a kol. 2015). Hlavní prevencí před šířením ACLSV je používání bezvirózního materiálu v ovocných sadech. ACLSV se často vyskytuje ve směsných infekcích, například s *Apple stem grooving virus* nebo *Apple stem pitting virus*. Ztráty na úrodě způsobené tímto virem se pohybují okolo 30 % - 40 % (Nemchinov a kol. 1995 cit. dle Rana a kol. 2010; Malan a kol. 2015; Guo a kol. 2016; Ondrušíková a kol. 2016).

Původně byl tento virus řazen do rodu *Closterovirus*, v současné době spadá do rodu *Trichovirus*, tento rod se řadí do čeledi *Betaflexiviridae*. Izoláty získané v různých částech světa se sekvenčně liší, což je zmíněno v kapitole

6.1 Geografické rozšíření a Genetická variabilita ACLSV. Jeho velikost se pohybuje okolo 720 nm na délku a 12 nm v průměru a částice obsahuje asi 5 % - 5,2 % nukleové kyseliny. Kapsida viru má helikální strukturu s asi 190 otáčkami. Jedna otáčka je vysoká asi 3,80 nm a je tvořena přibližně 9 až 10 aminokyselinami. Obsahuje malé množství aromatických aminokyselin, což prokazují nízké hodnoty absorpance UV záření virovými částicemi (Bar - Joseph a kol. 1974; Pasquini a kol. 1988; Martelli a kol. 1994; Yoshikawa a kol. 2001).

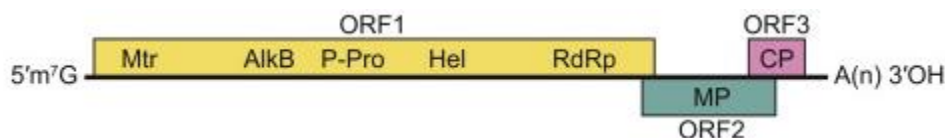
Zatím byly získány celogenomové sekvence osmadvaceti izolátů ACLSV: PBM1 (AJ243438), ACLSV-BJ (KU960942), SY1 (KM207212), SY2 (KU870524), SY3 (KU870525), QD-13 (KJ522693), JB (KC935956), YH (KC935955), KMS (KC935954), AC-ind (HE980332), Z3 (JN634761), Z1 (JN634760), Ta Tao 5 (EU223295), MO-5 (AB326225), B6 (AB326224), A4 (AB326223), Balaton 1 (X99752), P-205 (D14996), P863 (M58152), (NC\_001409), GW (KX506849), 38/85-A (KX579122), 38/85-B (KX579123), MB (KY310578), JH (KY310577), CJ (KY310576), CH (KY310575), BC (KY310574), MS (KC847061) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **5 Charakteristika genomu ACLSV a některých dalších členů rodu *Trichovirus***

Genomová nukleová kyselina ACLSV je představována jednořetězcovou +RNA o délce 7545 nt až 7555 nt. RNA ACLSV je upravena poly A sekvencí na 3' konci. Z celkového počtu bází genomové ssRNA je nejvíce zastoupen adenin s 31,5 % - 32 %, guanin je obsažen v genomové ssRNA v množství 23 % - 23,8 %, uracil je zastoupen 27 % a cytosin je dusíkatá báze, která je zastoupena v nejmenším množství 17,7 % - 18 %. Na 3' konci genomové ssRNA je 148 nukleotidů dlouhá nepřekládaná sekvence a na 5' konci je 190 nukleotidů dlouhá nepřekládaná sekvence (Yoshikawa a kol. 1988; German a kol. 1990; German a kol. 1997; Dhir a kol. 2013).

## 5.1 Charakteristika jednotlivých čtecích rámců ACLSV

Obrázek 2: Schéma genomu ACLSV (převzato z Virus taxonomy 2012)



Mtr = metyl transferáza; P-Pro = podjednotka proteázy; Hel = podjednotka helikázy; RdRp = RNA dependentní RNA polymeráza; MP = „movement protein“; CP = plášťový protein; ORF1 = otevřený čtecí rámec 1; ORF2 = otevřený čtecí rámec 2; ORF3 = otevřený čtecí rámec 3.

Sekvence prvního čtecího rámce ORF1 je dlouhá přibližně 5670 nukleotidů, kóduje polyprotein o zjištěné molekulární hmotnosti 216,5 kDa, který je tvořen 1890 aminokyselinami, významně se podílí na replikaci viru a tvoří jej 4 domény pro metyltransferázu, proteázu, helikázu, a RNA dependentní RNA polymerázu. Iniciační kodon je lokalizován na pozici 149 nt - 151 nt a stop kodon byl nalezen na pozici 5810 nt - 5812 nt. Methyltransferázová doména polyproteinu se nachází v jeho N' terminální oblasti 59 - 233 v aminokyselinovém pořadí. Helikáza se nachází na pozici 1060 - 1301 v aminokyselinovém pořadí. Oblast, na které je lokalizována polymeráza, odpovídá pozici 1643 - 1731 v aminokyselinovém pořadí na C' koncové oblasti proteinu (German a kol. 1990; German a kol. 1997; Marini a kol. 2008; Guo a kol. 2016).

Výše zmíněný iniciační kodon je druhým iniciačním kodonem prvního otevřeného čtecího rámce, ale právě on poskytuje signál pro zahájení translace na rozdíl od prvního iniciačního kodonu, který se nachází před ním na pozici 83 nt, ovšem tento je velmi těsně následován terminačním kodonem na pozici 95 nt (German a kol. 1990). Pozice iniciačních a stop kodonů ORF1 se mezi jednotlivými izoláty mohou lišit, pozice iniciačních a terminačních kodonů vybraných izolátů ACLSV jsou uvedeny v tabulce č. 1. Iniciační kodony, které neposkytují dostatečný signál pro zahájení translace, se vyskytují také u jiných zástupců rodu *Trichovirus* jakými jsou CMLV, APCLSV (James a kol. 2000; Liberti a kol. 2005).

Tabulka 1: Pozice iniciačních a stop kodonů otevřených čtecích rámců různých izolátů ACLSV

Izolát	ORF1 [nt]	ORF2 [nt]	ORF3 [nt]	Zdroj
P-205	152 - 5809	5727 - 7100	6784 - 7365	Sato a kol. 1993
Balaton 1	149 - 5812	5725 - 7106	6623 - 7371	German a kol. 1997
P863	152 - 5806	5718 - 7100	6613 - 7365	German a kol. 1990
Ta Tao 5	160 - 5804	5714 - 7056	6750 - 7333	Marini a kol. 2008
RC	150 - 5651	5716 - 7360	*	Dhir a kol. 2013

\* = Pozice iniciačního kodonu a terminačního kodonu nebyly uvedeny

Druhý čtecí rámec ORF2 je sekvence dlouhá 1377 nukleotidů a jejím produktem je "movement protein" o molekulární hmotnosti 51,3 kDa složený ze 459 aminokyselin. Na pozici 5725 nt - 5727 nt se nachází iniciační AUG kodon, který poskytuje dostatečný signál pro iniciaci translace, díky čemuž se 5' koncová oblast tohoto čtecího rámce překrývá s 3' koncovou oblastí ORF1. Stop kodon se nachází na pozici 7104 nt - 7106 nt, proto se 3' koncová oblast tohoto otevřeného čtecího rámce překrývá s 5' koncovou oblastí ORF3. Pozice iniciačních a stop kodonů ORF2 se mezi jednotlivými izoláty mohou lišit, jak je uvedeno v tabulce č. 1., což dokazují rozdíly v aminokyselinovém zastoupení syntetizovaného proteinu (German a kol. 1990; German a kol. 1997; Marini a kol. 2008).

"Movement proteiny" různých virů jsou si vzájemně podobné aminokyselinovými sekvencemi (German a kol. 1990; Melcher a kol. 1990; Mushegian a kol. 1993; Sato a kol. 1993). "Movement proteiny" virů jsou translatovány ribozomy a následně se kumulují nejvíce v oblasti buněčné stěny hostitelské buňky, 50 kDa protein ACLSV se akumuluje ve stejných buněčných strukturách. Díky rozdílné elektroforetické mobilitě izolovaných "movement proteinů" byla zjištěna jeho posttranslační modifikace, konkrétně fosforylace, ke které dochází v infikovaných buňkách rostlinných pletiv. Schopnost interakce 50 kDa proteinu s plazmodezmaty a transportu skrze tyto útvary je pravděpodobně závislá na N' koncové oblasti proteinu. Tento protein je ze všech produktů genomové nukleové kyseliny ACLSV nejvíce variabilní (Berna a kol. 1986; Godefroy-Colburn a kol. 1986; Candresse a kol. 1995; Sato a kol. 1995; German a kol. 1997; Satoh a kol. 2000; Niu a kol. 2012).

Třetí čtecí rámec ORF3 kóduje sekvenci dlouhou 744 nukleotidů, která má kapacitu pro syntézu polypeptidu o molekulární hmotnosti



28,1 kDa - 28,3 kDa složeného z 248 aminokyselin (German a kol. 1990; Sato a kol. 1993; German a kol. 1997). Expresí tohoto čtecího rámce dochází k syntéze pláštěvého proteinu o relativní molekulární hmotnosti 21,5 kDa - 22 kDa, složeného přibližně ze 193 aminokyselin. Iniciační AUG kodon tohoto čtecího rámce se nachází na pozici 6623 nt - 6625 nt a stop kodon je lokalizovaný na pozici 7369 nt - 7371 nt. Podobně jako v případě ORF1 je i zde v blízkosti prvního iniciačního kodonu také kodon terminační. Iniciační kodon na pozici 6791 nt - 6793 nt, který poskytuje lepší signál a iniciuje syntézu pláštěvého proteinu v buňkách rostlin, se nachází uvnitř čtecího rámce. Pozice iniciačních i stop kodonů ORF3 se mezi jednotlivými kmeny mohou lišit, jak je uvedeno v tabulce č. 1.

Pláštěvý protein vykazuje ze všech popsaných proteinů ACLSV nejvyšší konzervovanost. Pláštěvý protein vykazuje rozdílnou pohyblivost při elektroforetické separaci, což závisí na pořadí aminokyselin utvářejících pláštěvý protein a nikoliv na relativní hmotnosti pláštěvého proteinu. Samotný pláštěvý protein virů má celou řadu funkcí. Ovlivňuje replikaci a její efektivitu, modulaci symptomů a podílí se na potlačování RNA umlčování (Candresse a kol. 1995; Malinowski a kol. 1998 cit. dle Al Rwahnih a kol. 2004; Pasquini a kol. 1998; Callaway a kol. 2001; Thomas a kol. 2003; Lu a kol. 2004; Rana a kol. 2010).

Jednotlivé izoláty je možné rozdělit v závislosti na výstavbě pláštěvého proteinu na dvě skupiny, tzv. klastry B6 a P205. Konkrétně jde o aminokyseliny na pozicích 40, 59, 75, 130, 184. Virové izoláty ze skupiny B6 mají ve svém pláštěvém proteinu zařazené na pozicích 40 serin, 59 leucin, 75 tyrosin, 130 treonin a 184 leucin. Izoláty z klastru P205 se liší na pozici 40 aminokyselinou alanin, 59 valin, 75 fenylalanin, 130 serin a 184 metionin. Alanin a fenylalanin na pozicích 40 a 75 mají významný vliv na vyšší infekčnost a výraznější modulaci symptomů v případě klastru P205 ve srovnání se skupinou izolátů B6 (Yaegashi a kol. 2007).

Velikost pláštěvého proteinu viru ACLSV není konstantní a virové izoláty lze roztrždit do několika skupin lišících se velikostí a elektroforetickou mobilitou pláštěvého proteinu. Velikost pláštěvého proteinu jednotlivých skupin přitom souvisí s četností výskytu jejich zástupců. Například izoláty s pláštěvým proteinem o velikosti 22,7 kDa a 21,5 kDa identifikované v Itálii se vyznačovaly nejvyšší četností výskytu. Naproti tomu izoláty s velikostí pláštěvého proteinu 19,7 kDa se vyskytovaly vzácně.

Odlišnou velikost pláštěvého proteinu ACLSV můžeme zjistit také u izolátů infikujících odlišné hostitelské rostliny. Výše zmíněná skupina s nejmenší velikostí proteinového pláště byla pravděpodobně specializovaná pouze na peckoviny a způsobovala závažnější symptomy, než ostatní izoláty (Pasquini a kol. 1988; Ciešlínska a kol. 1995; Ciešlínska a kol. 2007a).

## **5.2 Organizace genomu některých dalších zástupců rodu *Trichovirus***

Ribonukleové kyseliny *Apricot pseudo - chlorotic leaf spot virus*, *Grapevine berry inner necrosis virus*, *Grapevine Pinot gris virus* obsahují 3 otevřené čtecí rámce kódující protein virové replikázy, „movement protein“ a pláštěvý protein. *Cherry mottle leaf virus* a *Peach mosaic virus* obsahují další otevřený čtecí rámec kódující „nucleic acid binding protein“.

První čtecí rámce virů APCLSV, GINV, CMLV, PcMV, GPGV jsou představovány sekvencemi o délce přibližně 5500 nt až 5800 nt, které kódují RdRp o relativní molekulární hmotnosti zhruba 216 kDa. Délka sekvence a pozice iniciačních a terminačních kodonů se mezi jednotlivými izoláty mohou lišit. Délky sekvencí jednotlivých čtecích rámců jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Charakteristika čtecích rámců ORF1, ORF2, ORF3 a ORF4

Virus	ORF1 [nt]	ORF2 [nt]	ORF3 [nt]	ORF4 [nt]	
APCLSV	108 - 5788	5698 - 7073	6755 - 7338	*	Liberti a kol. 2005
GINV	103 - 5708	5612 - 6666	6573 - 7162	*	Yoshikawa a kol. 1997
CMLV	178 - 5841	5753 - 7021	6741 - 7322	7470 - 7877	James a kol. 2000
PcMV	158 - 5817	5736 - 7004	6724 - 7304	7451 - 7863	James a kol. 2006
GPGV	105 - 5674	5578 - 6707	6590 - 7179	*	Gualandri a kol. 2007
Mr proteinů [kDa]					
Virus	1 [kDa]	2 [kDa]	3 [kDa]	4 [kDa]	
APCLSV	216,1	51,3	21,5	*	Liberti a kol. 2005
GINV	**	39,0	22,0	*	Yoshikawa a kol. 1997
CMLV	215,8	47,0	21,6	15,3	James a kol. 2000
PcMV	216,3	47,2	21,7	15,7	James a kol. 2006
GPGV	214	41,7	22,0	*	Gualandri a kol. 2007

1 = RdRp; 2 = "movement protein"; 3 = plášťový protein; 4 = "nucleic acid binding protein"; \* = Genomová RNA APCLSV, GINV a GPGV neobsahuje ORF4, "nucleic acid binding protein" nemůže být syntetizován; \*\* = pozice iniciačního kodonu a terminačního kodonu nebyly uvedeny.

Druhé čtecí rámce virů APCLSV, GINV, CMLV, PcMV, GPGV jsou představovány sekvencemi o délce přibližně 1000 nt až 1300 nt, které kódují "movement protein" o relativní molekulární hmotnosti 39 kDa - 51,3 kDa. Délka sekvence a pozice iniciačních a terminačních kodonů se mezi jednotlivými izoláty mohou lišit.

Třetí čtecí rámce virů APCLSV, GINV, CMLV, PcMV, GPGV jsou představovány sekvencemi o délce přibližně 600 nt - 800 nt, které kódují plášťový protein o relativní molekulární hmotnosti 21,5 kDa - 22 kDa. Délka sekvence a pozice iniciačních a terminačních kodonů se mezi jednotlivými izoláty liší.

Čtvrté čtecí rámce virů CMLV, PcMV jsou představovány sekvencemi o délce přibližně 400 nukleotidů, které jsou od ORF3 odděleny vždy krátkou nekódující oblastí. Sekvence ORF4 kódují "nucleic acid binding proteiny" o relativní molekulární hmotnosti 21,5 kDa - 22 kDa. Délka sekvence a pozice iniciačních a terminačních kodonů se mezi jednotlivými izoláty liší.

## **5.3 Konzervované a variabilní oblasti ACLSV**

### **5.3.1 Konzervované oblasti**

Vysoce konzervované oblasti se vyskytují v otevřeném čtecím rámci 1, konzervované oblasti se nachází v doméně helikázy, RdRp polymerázy a metyltransferázy. Další konzervované motivy se nacházejí v druhém otevřeném čtecím rámci v pozici 5565 nt - 5571 nt, tedy 145 nt před ssRNA genomovou sekvencí kódující "movement protein" a podobně také v třetím otevřeném čtecím rámci v pozici 6593 nt - 6599 nt, 177 nukleotidů před sekvencí kódující plášťový protein. Tyto konzervované oblasti mají charakter hexanukleotidů a jejich sekvence je UUAGGU a slouží jako startovací sekvence v procesu transkripce obou subgenomických RNA (German a kol. 1990; German a kol. 1997; Dhir a kol. 2013).

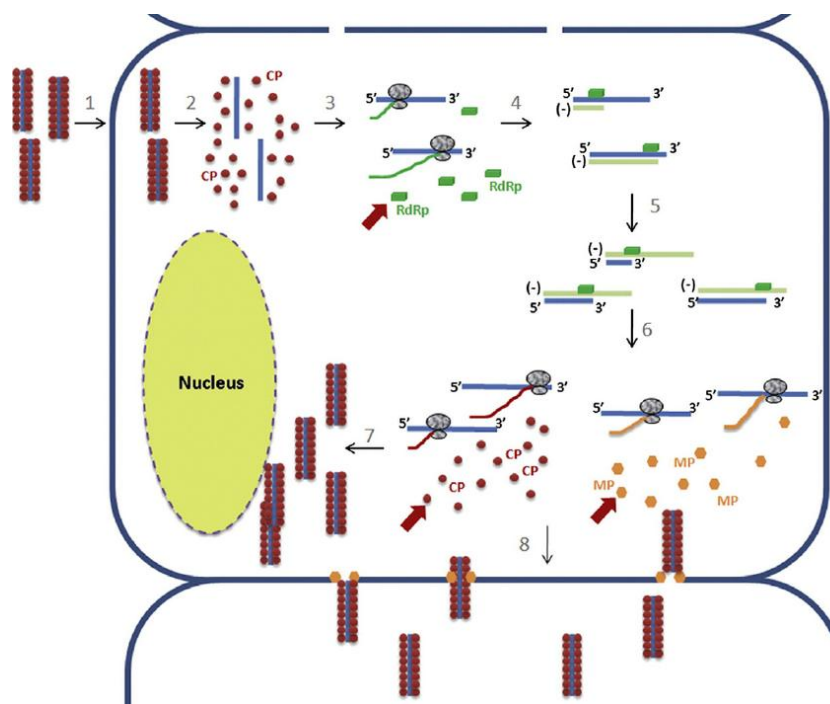
### **5.3.2 Variabilní oblasti**

V genomu ACLSV byly nalezeny vedle konzervovaných také variabilní oblasti. První se nachází mezi konzervovanými doménami metyltransferázy a proteázy v pozici 602 nt - 672 nt ve čtecím rámci ORF1. Ani jeden z izolátů ACLSV nesdílel v této oblasti větší než 20% shodu. V případě indického izolátu byla objevena další hypervariabilní oblast lokalizovaná za doménou RNA dependentní RNA polymerázy, izoláty v této oblasti vykazovaly identitu pouze 41 % - 43 %. Druhá hypervariabilní oblast se nachází v C' koncové oblasti ORF2 a třetí v N' koncové oblasti ORF3 (German a kol. 1997; Mathioudakis a kol. 2010; Dhir a kol. 2013).

### 5.3.3 Syntéza RNA molekul ACLSV

Replikace genomu se nejspíše děje přes 6 různých molekul dsRNA. Infekce rostlinné buňky ACLSV má však za následek syntézu pouze malého množství uvedených dvouvláknových nukleových kyselin. Největší z těchto dsRNA I se také vyskytuje v nejmenším množství, má podobnou velikost jako genomová ssRNA a jedná se tak nejspíše o její dvouvláknovou formu. V procesu replikace totiž virus syntetizuje –RNA řetězec, který je komplementární k +RNA vláknu genomové ssRNA, následně je podle –RNA vlákna na jeho 3' konci syntetizováno nové +RNA vlákno. Další dvě velké dsRNA II a III mají velikost 6,4 kbp respektive 5,4 kbp, jejich funkce a původ však nejsou známy. Tři menší molekuly dsRNA IV, V a VI mají molekulovou délku 2,2 kbp respektive 1,1 kbp a 1 kbp a odpovídají nejspíše dvouvláknové formě pravděpodobné mRNA pro plášťový a "movement protein". Funkce dsRNA VI je podobně neznámá jako II a III a odpovídá přepisu vnitrogenomové oblasti RNA ACLSV (Dodds a kol. 1998; Yoshikawa a kol. 1988; German a kol. 1992).

Obrázek 3: Životní cyklus +RNA rostlinných virů (převzato z Safarnejad a kol. 2011).



RdRp = RNA dependentní RNA polymeráza; CP = plášťový protein; MP = "movement protein"; obrázek znázorňuje replikační cyklus +RNA rostlinných virů, syntézu virových proteinů translačním aparátem hostitelské buňky a transport virových částic do sousedních rostlinných buněk; 1 = průnik virů do buňky; 2 = disociace plášťového proteinu; 3 = translace virové RdRp; 4 = syntéza -RNA; 5 = syntéza +RNA; 6 = translace zbývajících virových proteinů; 7 = skládání virových částic; 8 = "movement protein" umožňuje transport plazmodezmaty.

## 6 Molekulární variabilita ACLSV

Nukleotidové sekvence genomu ACLSV vykazují vysokou genetickou variabilitu mezi jednotlivými izoláty, nejčastěji v rozmezí 10 % až 20 %. Na variabilitu a evoluci RNA virů mají vliv mutace, jejich příčinou je nepřesnost RNA polymerázy při zařazování nukleotidů v průběhu syntézy komplementárních řetězců a rekombinace. Variabilitu sekvencí lze mezi jednotlivými izoláty ACLSV dokázat SSCP analýzou (Roossinck a kol. 1997; Rwanih a kol. 2004; Nakahara a kol. 2011), ale preferovanější metodou je sekvenování.

## 6.1 Geografické rozšíření a genetická variabilita ACLSV

Nukleotidové i aminokyselinové sekvence ACLSV vykazují vysokou variabilitu. Sekvence ACLSV vykazují největší procentuální identitu nejčastěji mezi sekvencemi izolátů pocházejících ze stejného státu nebo kontinentu. Některé izoláty z Itálie, Řecka, ale také asijských států však vykazují vyšší nebo obdobnou shodu se sekvencemi pocházejícími z jiných kontinentů. Variabilita mezi sekvencemi izolátů z odlišných kontinentů dosahovala hodnot nejvýše okolo 15 % - 30 % (Pasquini a kol. 1998; Al Rwanih a kol. 2004; Gadiou a kol. 2010; Mathioudakis a kol. 2010; Püpola a kol. 2011; Rana a kol. 2010; Song a kol. 2011; Guo a kol. 2016; Wu a kol. 2010).

## 6.2 Genetická variabilita dalších zástupců rodu *Trichovirus*

Genetická variabilita ostatních zástupců rodu *Trichovirus* není tak podrobně prozkoumaná jako v případě ACLSV. Vysokou variabilitu ale vykazují sekvence CMLV a GINV. Aminokyselinová sekvence "movement proteinu" izolátů *Cherry mottle leaf virus* vykazuje vyšší variabilitu než v případě plášťového proteinu a RNA dependentní RNA polymerázy CMLV, podobně jako v případě ACLSV. Variabilita aminokyselinové sekvence "movement proteinu" se pohybuje v rozmezí 11,3 % - 19 %. Genomová ribonukleová kyselina CMLV obsahuje v prvním otevřeném čtecím rámci motivy pro metyltransferázu, oxygenázu, peptidázu, helikázu a RdRp polymerázu. V prvním otevřeném čtecím rámci CMLV se nachází minimálně jedna variabilní oblast za doménou metyltransferázy. V této oblasti vykazují izoláty identitu nižší než 69 % (Su a kol. 2016). *Cherry mottle leaf virus* je nejpříbuznější *Peach mosaic virus*, aminokyselinová identita mezi proteinovými sekvencemi CMLV a PcMV se pohybuje v rozmezí 54 % - 83 %. Nejvyšší variabilitu vykazuje aminokyselinová sekvence proteinu kódovaného čtvrtým otevřeným čtecím rámcem. Aminokyselinové sekvence proteinů CMLV a ACLSV vykazovaly identitu v rozmezí 46,7 % - 63,6 % v závislosti na zkoumaném otevřeném čtecím rámci a izolátu ACLSV. Aminokyselinové sekvence proteinů PcMV vykazují se sekvencemi aminokyselin proteinů ACLSV identitu v rozmezí 47 % - 60 % (James a kol. 2000; James a kol. 2006).

Nukleotidové sekvence *Grapevine berry inner necrosis virus* vykazují podobně jako v případě ACLSV variabilitu mezi izoláty, ta ale v případě GINV není na rozdíl od ACLSV dobře prozkoumána. Variabilita nukleotidové sekvence kódující plášťový protein dosahuje maximálně 21,5 %. Sekvence kódující "movement protein" vykazuje variabilitu maximálně 31,2 %. V plášťovém proteinu GINV je konzervována aminokyselina arginin na pozici 104 a kyselina asparagová na pozici 147. Viru GINV je pravděpodobně nejpříbuznější *Grapevine Pinot gris virus*, identita mezi nukleotidovými sekvencemi GINV a GPGV je 69 %. Sekvence aminokyselin GINV i nukleotidů GPGV vykazují identitu také s ostatními zástupci k rodu *Trichovirus*. Nukleová sekvence viru GPGV vykazovala identitu 49 % se sekvencí ribonukleové kyseliny ACLSV. Nejnižší identitu vykazovala sekvence ribonukleové kyseliny GPGV se sekvencí CMLV. Aminokyselinové sekvence GINV vykazují identitu 36 % - 55 % se sekvencemi aminokyselin jednotlivých proteinů ACLSV (Yoshikawa a kol. 1997; Glasa a kol. 2014; Fan a kol. 2017).

Genom *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* je organizován podobně jako v případě ACLSV. Konzervované oblasti jsou představovány metyltransferázou, proteázou, helikázou a RdRp v ORF1. Sekvence APCLSV vykazují nejvyšší identitu 65,8 % - 66,7 % se sekvencemi ACLSV a nejnižší identitu 59,8 % respektive 55,1 % s CMLSV a GINV (Liberti a kol. 2005).

## 7 Okruh hostitelů ACLSV

ACLSV napadá převážně druhy z čeledi růžovitých (*Rosaceae*), která obsahuje rozličné druhy dřevin, ale také keřů a bylin pěstovaných prakticky po celém světě v zahradách a sadech (Lister a kol. 1970; Németh a kol. 1986; Katsiani a kol. 2014). Do této čeledi spadají druhy, které se pěstují pro své plody, jakými jsou jablka, hrušky, švestky, broskve a meruňky. Rostlinné druhy, které mohou být hostitelským organizmem, jsou uvedeny dále v textu v kapitole 8.1 Geografické rozšíření ACLSV.



## 7.1 Okruh hostitelů dalších zástupců rodu *Trichovirus*

PcMV napadá hlavně broskvoně, mandloně, slivoně, švestky a meruňky (Cochran a kol. 1940 cit. dle Gispert a kol. 1998; Oldfield a kol. 1995). CMLV napadá třešně, broskvoně a meruňky. Oba tyto viry jsou přenášeny vektory. CMLV přenáší *Eriophyes inaequalis* a PcMV přenáší *Eriophyes insidiosus* (James a kol. 1993; Oldfield a kol. 1995; Mekuria a kol. 2013).

GINV napadá vinnou révu, byl poprvé objeven v Japonsku a působí značné škody v oblasti Yamanashi (Kunugi a kol. 2000 cit. dle Fan a kol. 2017). GPGV napadá vinnou révu a také některé byliny *Silene latifolia* a *Chenopodium album* (Gualandri a kol. 2017).

Okruh hostitelů APCLSV je podobný jako v případě ACLSV. APCLSV napadá meruňky, slivoně, broskvoně a jabloně (Liberti a kol. 2005).

*Phlomis mottle virus* byl objeven v roce 2006 a zatím pravděpodobně jedinou hostitelskou rostlinou byla *Phlomis fruticosa* L. (Saldarelli a kol. 2008).

## 8 Příznaky chlorotické skvrnitosti listů jabloně na různých hostitelích

Chlorotická skvrnitost listů jabloně je chorobou, jejíž symptomy jsou rozdílné v závislosti na napadeném druhu rostliny, jejím stáří, fyziologickém stavu a na virovém kmeni. U jabloní napadených ACLSV pozorujeme světle zelené nebo žluté skvrny, kruhy a kresby na listech, popřípadě (asymetrické) deformace listů, jejich nekrózy a předčasný opad listů. Na plodech se objevují červenohnědé kruhy, tzv. rzivost slupek plodů a na kmeni se mohou objevovat znaky nekrotického poškození kůry (Lister a kol. 1970; Desvignes a kol. 1988).

Na citlivých odrůdách broskvoní je možné pozorovat tmavě zelené skvrnité listy nebo chlorotické nekrózy. Někdy se objevují také kruhy nebo skvrny na plodech, žloutnutí žilnatiny. Naprostá většina odrůd je ale infikována, aniž by se přítomnost viru projevovala (Desvignes a kol. 1988; Bazzoni a kol. 2010).

Meruňky reagují na přítomnost viru různě a některé nevykazují žádné nebo jen mírné příznaky. Většinou je pozorováno poškození listů, žluté nekrózy a žloutnutí žilnatiny. Může také dojít k inkompatibilitě roubu a podnože

(Nemeth a kol. 1986; Desvignes a kol. 1988; Yoshikawa a kol. 2001; Bazzoni a kol. 2010).

Na citlivých kultivarech slivoní mohou být pozorovány falešné příznaky šarky švestky označované jako "pseudopox", štěpení kůry a odumření stromu, také žluté nekrózy a tečky na listech a jejich deformace a žloutnutí žilnatiny listů (Desvignes a kol. 1988; Yoshikawa a kol. 2001; Bazzoni a kol. 2010).

Na třešni se infekce ACLSV projevuje nekrózou listů a plodů, objevuje se praskání kůry a často byla pozorována inkompatibilita roubu a podnože (Németh a kol. 1986; Desvignes a kol. 1988; Yoshikawa a kol. 2001; Malan a kol. 2015).

## 8.1 Geografické rozšíření ACLSV

ACLSV napadá hlavně rostliny z čeledi (*Rosaceae*) a je rozšířen celosvětově. Virus byl zaznamenán v Evropě, kde se vyskytuje v celé řadě států, například v Řecku, bývalé Jugoslávii, České republice, Bosně a Hercegovině, Litvě, Finsku, Bulharsku, Polsku, Itálii, Španělsku a Srbsku. Napadány jsou jabloně, v Řecku je napadeno 65,7 % jabloní a v bývalé Jugoslávii bylo prokázáno napadení 40 % - 90 % jabloní. V Litvě bylo ACLSV napadeno menší množství jabloní než v Řecku i Jugoslávii, konkrétně 23,8 %. ACLSV napadá jabloně i v České republice a Polsku. Virus infikuje také broskvoně, v Bosně a Hercegovině je napadeno 64 % stromů. Dalšími hostiteli mohou být hrušně, meruňky, třešně, višně, mandloně a slivoně. ACLSV se často vyskytuje ve směsných infekcích nejčastěji s ASPV (Babović a kol. 1986 cit. dle Svoboda a kol. 2010; Lemmetty a kol. 1989 cit. dle Svoboda a kol. 2010; Ciešlínska a kol. 1995; Myrta a kol. 2003; Polák a kol. 2006; Mandić a kol. 2007; Polák a kol. 2007; Lolić a kol. 2010; Mathioudakis a kol. 2010; Svoboda a kol. 2010; Püppöla a kol. 2011; Borisova a kol. 2014).

Na asijském kontinentu byla přítomnost ACLSV zaznamenána nejméně v 7 státech, konkrétně v Sýrii, Jordánsku, Turecku, Japonsku, Indii, Číně a Koreji. Virus napadá jabloně v Japonsku, kde působí velké škody. V Indii ACLSV napadá plané rostliny i kultivary broskvoně, jabloně, meruňky a v oblasti Himachal Pradesh mandloně. Obdobně jako v Evropě se ACLSV vyskytuje ve směsných infekcích nejčastěji s ASGV, ApLV a AGCaV. Směsné infekce byly zjištěny například v Koreji (Yanase a kol. 1974 cit. dle Salmon a kol. 2002; Yürektürk a kol. 1984 cit. dle Ulubas a kol. 2004; Myrta a kol. 2003; Ulubas a kol. 2004; Salem a kol. 2005;

Ismaeil a kol. 2006; Rana a kol. 2007; Rana a kol. 2008; Wu a kol. 2010; Cho a kol. 2016; Guo a kol. 2016; Katwal a kol. 2016).

V Africe byl ACLSV identifikován minimálně v jednom státě, kterým je Tunisko, kde ACLSV napadá jabloně a broskvoně, zaznamenány byly také směsné infekce s ASPV (Mahfoudhi a kol. 2013).

V Austrálii je výskyt zaznamenán ve většině sadů jaderovin, objevují se tam také směsné infekce. Na Novém Zélandu jsou zamořeny výsadby jabloní (Wood a kol. 1973; Constable a kol. 2007).

## **8.2 Metody detekce viru**

ACLSV může být detekován celou řadou laboratorních metod, nejčastěji se používají DAS ELISA nebo reverzní transkripce a následné polymerázové řetězové reakce. RT - PCR je často využívána pro svou citlivost.

Dalšími metodami pro detekci ACLSV jsou nested RT - PCR a multiplex PCR. Tyto metody jsou vysoce specifické a vykazují vyšší citlivost než DAS ELISA test (Kinard a kol. 1996; Menzel a kol. 2002; Ulubas a kol. 2004; Wang a kol. 2011; Watpade a kol. 2012; Ji a kol. 2013; Katsiani a kol. 2014; Malan a kol. 2015).

ACLSV je možné detekovat pomocí real time PCR a krátké fluorescenčně značené MGB DNA próby. Metoda umožňuje citlivou a jednoznačnou identifikaci patogenu pomocí sond cílených na konzervované oblasti v genomových sekvencích virových izolátů (Salmon a kol. 2002).

## **8.3 Ozdravování rostlin**

Ochrana rostlin před ACLSV je dosti problematická. Virus je přenášen vegetativně, proto se klade důraz na používání certifikovaného rostlinného materiálu, jehož produkcí se zabývá například organizace SAPO. V České republice je zaveden systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu révy vinné a ovocných dřevin. Tento systém je v souladu se systémem EPPO a předpisy EU. Příprava bezvirozního materiálu je možná pomocí kultivace apikálních meristémů (Wang a kol. 2006; Malan a kol. 2015; Ondrušíková a kol. 2016).

Pro ozdravování rostlin se využívá chemoterapie a termoterapie in vivo nebo in vitro. Proces termoterapie dokáže inhibovat průběh replikace a distribuci virových částic. Některá virostatika jako ribavirin dokáží ovlivňovat zdravotní stav rostlin i rychlost růstu rostlin a jejich kořenů. Úspěšnost chemoterapie nebo termoterapie závisí na druhu, odrůdě rostlin a způsobu aplikování chemoterapeutika a vysoké teploty. Ne všechny rostliny jsou schopny přežít zvýšené teploty nebo koncentrace chemických látek. Například broskvoně, meruňky a třešně jsou citlivé na proces termoterapie. Jádroviny jsou obecně odolnější vůči vyšším teplotám a působení virostatik. Virostatikem, které se používá v procesu ozdravování rostlin, je Virazole (Janečková a kol. 1993 cit. dle Pavelková a kol. 2015; Spiegel a kol. 1995; Ciešlínska a kol. 2002; Ciešlínska a kol. 2007b; Wang a kol. 2006).

## 9 Metodika

### 9.1 Biologický materiál

Bakterie: *Escherichia coli* dh5 alpha

Listy švestky domácí ze stromů č. 153, 154 a 155 (*Prunus domestica*) pěstovaných na okraji obce Šumice.

### 9.2 Izolace virové RNA

Izolace virové RNA byla prováděna pomocí kitu NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant (Machery Nagel). 0,9 - 1,1 mg lyofilizovaných listů vzorku 153, 154 a 155 bylo přeneseno do mikrozkušavky spolu s 350  $\mu$ l RA1 pufru, 3,5  $\mu$ l  $\beta$  - merkaptoetanolu a homogenizováno s homogenizační kuličkou v homogenizátoru FastPrep (MP) nastaveném na 5 m/s a 60 s. Homogenát byl přenesen z mikrozkušavky na Place NucleoSpin Filtr, po centrifugaci při 11 000 g po dobu 60 s byl filtrát přenesen do nové sběrné mikrozkušavky. K filtrátu bylo přidáno 350  $\mu$ l 70% etanolu a směs byla promíchána na třepačce. Následně byl filtrát přenesen do NucleoSpin RNA Plant Column a centrifugován při 11 000 g a 30 s. NucleoSpin RNA Plant Column byl přenesen do nové sběrné zkumavky a její silikátová membrána byla vysušena centrifugací při 11 000 g a 60 s po přidání 350  $\mu$ l MDB. Na střed membrány bylo naneseno 95  $\mu$ l roztoku DNázy, která byla připravena smíšením 10  $\mu$ l DNázy a 90  $\mu$ l reakčního pufru, následně byla směs promíchána na třepačce a poté inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Pro promytí bylo na ni naneseno 200  $\mu$ l RA2 a centrifugováno při 11 000 g a 30 s. Po dokončení centrifugace byla sběrná zkumavka zbavena filtrátu a vyklepnuta, poté byla do ní vrácena kolonka, na jejíž střed bylo naneseno 600  $\mu$ l RA3 a opět byla provedena centrifugace při 11 000 g a 30 s. Po dokončení centrifugace byla sběrná zkumavka zbavena filtrátu, poté do ní byla vrácena kolonka, na jejíž střed bylo naneseno 250  $\mu$ l RA3, následně byla provedena centrifugace při 11 000 g a 120 s, membrána byla touto centrifugací vysušena. Kolonka byla přenesena do nové sběrné mikrozkušavky pro eluci vysoce čisté RNA. Pro následné uvolnění izolované RNA ze silikátové membrány kolonky bylo na střed této membrány naneseno 60  $\mu$ l "RNáze - free" vody a byla provedena centrifugace při 11 000 g a 60 s. Po poslední

provedené centrifugaci byla spektrofotometricky změřena koncentrace a čistota izolované RNA.

### 9.3 Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí Bioskript RT polymerázy a random primerů, následně byla provedena polymerázová řetězová reakce. Ta byla prováděna pro amplifikaci specifických sekvencí. Nejprve byla připravena reakční směs smícháním následujících reagentů: 12  $\mu\text{l}$  Red reaction buffer (5x), 13  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 1,2  $\mu\text{l}$  F1 primeru (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 1,2  $\mu\text{l}$  R1 primeru (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 0,6  $\mu\text{l}$  MyTag polymerázy (5U/ $\mu\text{l}$ ). Následně byla směs centrifugována při laboratorní teplotě a promíchána na třepačce a opět centrifugována při laboratorní teplotě. K 18  $\mu\text{l}$  napipetované reakční směsi bylo přidáno 2  $\mu\text{l}$  vzorku reverzního transkriptu virové RNA. PCR mikrozkušavky byly následně centrifugovány při laboratorní teplotě a vloženy do PCR cyklu, nastavení termocyklu pro reverzní transkripci a polymerázovou řetězovou reakci je uvedeno v tabulkách č. 3 a 4.

Tabulka 3: Nastavení termocyklu pro reverzní transkripci

Reakční směs 1	
Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]
70	5
Reakční směs 2	
Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]
25	10
42	30

Tabulka 4: Nastavení termocyklu pro PCR amplifikaci reverzního transkriptu ACLSV

Fáze	Počet cyklů	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]
Počáteční denaturace	1x	94	5
Denaturace	35x	94	0,5
Hybridizace primerů		44 - 52	0,5
Prodlužování primerů		72	1,5
Finální extenze	1x	72	10

Tabulka 5: Primery použité pro amplifikaci genomických segmentů ACLSV (Niu a kol. 2012)

	Primer	Teplota hybridizace [°C]
F1	TGATACTGATACAGTGTACACTCACG	52
R1	TTGTCAAAGAACCAATCCTTCATGC	
F2	AAGAAACCTGATGTACAATC	44
R2	CTTTTGGTAACCTGCAGGCAT	
F3	AATGAGGAGTGTTATGACGATGA	47
R3	ATCGAACTTTGTTTCATCTAT	
F4	TACTTTTGTCCCTAAGGATG	48
R4	TGTCGTCCCAACCAAAATG	
F5	TACCGGATAATTACTACATT	47
R5	TGCATCAATTGATATGGACAGT	
F6	TTCGTTTTCAAGGTCATGCC	50
R6	TTGATGTTCCGGTCCGAAG	

## 9.4 Elektroforéza

Bylo připraveno 50 ml 1,5% agarózového gelu v TAE pufru s 3 µl Good View barviva. Po zatuhnutí agarózy byl vyjmut hřebínek a do elektroforetické komůrky byl nalit přenosový TAE pufr. Vzorke byly nanoseny do jamek vytvořených hřebínkem. Následně byla komůrka přikryta víkem a napojena na zdroj elektrického proudu. Po uběhnutí doby potřebné k dostatečné separaci vzorků byla elektroforetická komůrka odpojena od zdroje proudu. Gel byl vytažen z komůrky a opatrně z něj byl vylit zbytek přenosového pufru. Následně byl vyhodnocen výsledek elektroforetické separace.

## 9.5 Klonování

Transformace bakterií byla provedena pro získání velkého množství produktu k sekvenční analýze. Použit byl komerční kit pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector Systems. Ligační směs byla připravena ve sterilních podmínkách laminárního boxu a skládala se z pGEM - T ligačního pufru v objemu 5 µl (2x), plazmidu pGEM - T easy v objemu 0,5 µl (50 ng/µl), PCR produktu o objemu 3,5 µl a 1 µl ligázy, (3U/µl). Nakonec byla směs opatrně promíchána a centrifugována při laboratorní teplotě. Takto připravená

ligační směs byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C. Po ukončení inkubace ligační směsi bylo smícháno 50 µl bakteriální suspenze s 5 µl připravené ligační směsi, obsah mikrozkušavky byl opatrně promíchán a inkubován na ledu po dobu 20 minut. Transformace těchto bakterií byla provedena pomocí teplotního šoku, buňky byly inkubovány při teplotě 42 °C po dobu 45 s. Následně byly bakterie přeneseny na led, kde byly inkubovány alespoň 2 min. Po dokončení inkubace bylo do mikrozkušavky napipetováno 850 µl SOC média a bakteriální suspenze byla inkubována na rotační třepačce po dobu 1,5 h.

## **9.6 Očkování agarových ploten**

Transformované bakteriální buňky byly zakoncentrovány centrifugací po dobu 3 min při 5000 g při laboratorní teplotě. Po centrifugaci bylo odpipetováno přibližně 850 µl supernatantu a sediment byl rozsuspendován v přibližně 50 µl SOC média. Rozsuspendované buňky byly přepipetovány na povrch kultivačního média a rozetřeny kličkou a inkubovány při teplotě 37 °C, druhý den byla vyhodnocena transformace bakterií.

## **9.7 Test pozitivních kolonií, ověření úspěšnosti ligace a transformace**

Pro testování pozitivních kolonií byla využita PCR reakce s primery M13. Byla připravena reakční směs, do mikrozkušavky byl napipetován reakční pufr v objemu 5 µl (5x), deionizovaná PCR voda v objemu 19,55 µl, F primer v objemu 0,13 µl (20 pmol/µl) a R primer v objemu 0,13 µl (20 pmol/µl). Nakonec byla napipetována Taq polymeráza v objemu 0,2 µl (5U/µl). Reakční směs byla centrifugována při laboratorní teplotě a protřepána, následně byla rozpipetována do připravených PCR mikrozkušavek po 25 µl. Vybrané bíle zbarvené bakteriální kolonie byly přeneseny na novou agarovou plotnu. Po přenosu bakterií bylo párátko omáčeno v reakční směsi, která byla rozpipetována do jednotlivých PCR mikrozkušavek. PCR mikrozkušavky byly následně centrifugovány při laboratorní teplotě a vloženy do PCR cyklu, nastavení termocyklu je uvedeno v tabulce č. 6. Následně byla provedena izolace PCR produktu z gelu.



Tabulka 6: Nastavení termocykleru pro PCR amplifikaci s primery M13

Fáze	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [min]
Uvolnění a denaturace plazmidu	1x	95	5
PCR amplifikace	25x	95	0,5
		55	0,5
		72	0,5
Elongace	1x	72	10

## 9.8 Izolace vzorků z gelu

Separace PCR produktů proběhla v 1,5% agarózovém gelu s přidavkem 5  $\mu$ l ethidium bromidu do 75 ml gelu. Gel byl přenesen na UV transluminátor, pomocí sterilních skalpelů byly z gelu vyříznuty jednotlivé PCR produkty a přeneseny do mikrozkušavek. Do zkumavek byl napipetován QG pufr v poměru 3:1 k hmotnosti vyříznutého gelu. Tyto mikrozkušavky byly pro rozpuštění gelu inkubovány v dry - blocku po dobu 10 min při teplotě 50 °C. Do zkumavky byl napipetován izopropanol v poměru 1:1 k hmotnosti gelu a mikrozkušavka byla promíchána na třepačce. Na kolonku pro izolaci DNA byla napipetována rozpuštěná směs (maximální objem 700  $\mu$ l) a následně centrifugována po dobu 1 min při 15 000 g. Zkušavka byla vylita, vyklepnuta a na kolonku bylo napipetováno 500  $\mu$ l QG pufru a centrifugována po dobu 1 min a 15 000 g. Zkušavka byla vylita, vyklepnuta a na kolonku bylo napipetováno 750  $\mu$ l PE pufru, a centrifugována po dobu 1 min při 15 000 g. Zkušavka byla vylita, vyklepnuta a centrifugována po dobu 1 min při 15 000 g. Kolonka, na kterou bylo napipetováno 30  $\mu$ l destilované vody, byla umístěna do nové sběrné zkumavky a centrifugována po dobu 1 min při 15 000 g. Koncentrace izolované DNA byla zjištěna pomocí fluorimetru a vzorky byly vysušeny na dry - blocku při 55 °C po dobu 30 min a následně byly smíšeny s 8  $\mu$ l deionizované vody.

## 9.9 Sevenační značení

Pro přípravu vzorku na Sangerovo sekvenování bylo provedeno sekvenační značení PCR fragmentů pomocí kitu BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Reakční směsi byly centrifugovány při laboratorní teplotě, promíchány na třepače a centrifugovány při laboratorní teplotě. Následně byly rozpipetovány po 4  $\mu$ l do jednotlivých PCR mikrozkušavek a do každé bylo napipetováno 6  $\mu$ l (4ng/ $\mu$ l) vzorku, PCR mikrozkušavky byly opatrně protřepány, centrifugovány při laboratorní teplotě a umístěny do termocyklieru, nastavení termocyklieru je uvedeno v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Nastavení termocyklieru pro sekvenační značení

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
1x	96	1 min
35x	96	10 s
	50	5 s
	60	4 min

## 9.10 Bioinformatická analýza

Primární výstupy byly sestaveny do kontigů v programu SegMan Lasergene (DNASTAR®). Složené kontigy byly analyzovány v programu MEGA 7 a algoritmu Clustal W a porovnávány s referenčním genomem, kterým byl NC 014009. Byly identifikovány iniciační a stop kodony pro identifikaci jednotlivých čtecích rámců. V programu nucleotide Blast a protein Blast byla zjištěna procentuální identita získané sekvence se sekvencemi z databáze GeneBank. Pro sestavení konečné sekvence byly vybrány ty sekvence PCR produktů, které vykazovaly na úrovni nukleotidů největší identitu s referenčním genomem. Mezi jednotlivými sekvencemi PCR produktů a také mezi konečnou sestavenou sekvencí a referenčním genomem byl zjištěn počet záměn nukleotidů a aminokyselin. Pro fylogenetickou analýzu byly využity sekvence stažené z databáze Genebank a sestavená sekvence 154, samotná analýza byla provedena v programu MEGA 7 (MEGA Software). Fylogenetická analýza byla provedena pomocí metody neighbor-joining. Tree Explorer byl využit pro zobrazení výsledků. Rekombinační analýza byla provedena v programu RDP4 v4.85 s použitím algoritmů RDP, GENECONV, BOOTSCAN/RESCAN, MAXCHI a CHIMAERA.

## 9.11 Pomůcky

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

Elektroforetická komůrka: HU10 Mini - Plus Horizontal (Scie - Plas)

Fluorometr: Hofer DyNA Quant 200 fluorometer (Amersham Biosciences)

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

Homogenizátor: FastPrep<sup>®</sup> - 24 (MP Biomedicals)

Laminární box: PV - 100 (Telstar)

Spektrofotometr: NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC)

Stolní centrifuga: Biofuge pico<sup>™</sup> (Heraeus<sup>™</sup>)

Mikrovlnná trouba: MA 85050 (OTF)

Mini centrifuga: Prism<sup>™</sup> mini (Labnet)

Mini centrifuga: Spectrafuge<sup>™</sup> mini - centrifuge (Labnet)

Stolní centrifuga: Spectrafuge<sup>™</sup> 24D (Labnet)

Termoblok: Mixing Block MB - 102 (BIOER)

Termocykler: T100 Thermal Cyclers (BIO RAD)

Termocykler: T personal (Biometra)

Třepačka: Bio RS - 24 (BioSan)

Třepačka: IKA<sup>®</sup> MS2 mini shaker (Gemini BV)

Výrobník ledu: Icematic F100 Compact (Gemini BV)

Zdroj stejnosměrného elektrického proudu: MS - 250V (Major science) a Power station 300 (labnet)

## 9.12 Reagencie a biologický materiál

### Kity

BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)

QIAquick Gel Extraction Kit 250 (Qiagen)

NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant (Marchery - Nagel)

pGEM<sup>®</sup> - T Easy Vector Systems (Promega)

### Pufry

1x TAE pufr

40 mM Tris-acetate + 1 mM EDTA ph 8: 4,84g Tris + 1,142 ml ledové kyseliny octové + 0,5 M EDTA 2ml, upravit na pH 8 a doplnit na 1000 ml.

10x TNE pufr

12,11 g, 100Mm Tris + 3,72 g 10 mM EDTA NA<sub>2</sub> x 7 H<sub>2</sub>O + 116,89 NaCl, rozpustit v cca 800 ml vody a upravit pH na 7,4 pomocí HCl, doplnit do 1000 ml destilovanou vodou. Před použitím filtrovat (0,45 µm).

### Média

SOC médium

2 g peptonu, 0,5 g kvasničného extraktu, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl rozpustit v 97 ml destilované vody, autoklávovat a ochladit na pokojovou teplotu. Přidat 1 ml roztoku 2M Mg<sup>2+</sup>, 1 ml 2M roztoku glukózy.

LB médium

10 g hydrolyzátu kaseinu, 5 g kvasničného autolyzátu, 5g peptonu, 10 g NaCl, 16 - 18 g Agar (tuhé LB) a 1000 ml destilované vody, upravit pH na 7,2 - 7,4 a autoklávovat 25 - 30 min / 120°C.

## Chemikálie

Agarose I<sup>TM</sup> (Amresco)

BioScript<sup>TM</sup> (Bioline)

β - merkaptoetanol

Deionizovaná voda

dEPC voda

Etanol 70%

Etanol 98,8% pro UV spektroskopii (Lachner)

Ethidium bromid 1% roztok ve vodě

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific<sup>TM</sup>)

GoodView<sup>TM</sup> Nucleic Acid Stain (SBS Genetech)

Hoechst: Rozpustit 10 mg Hoechst 33258 v 10 ml destilované vody

Izopropanol (Lachner)

MyTag<sup>TM</sup> Red DNA Polymerase (Bioline)

## 10 Výsledky

V průběhu praktické části byly získány dílčí sekvence z 3 vzorků označených 153, 154, 155 celkové RNA ze stromu *Prunus domestica* (švestka domácí), pěstované na okraji obce Šumice v okrese Uherské Hradiště.

Byla provedena reverzní transkripce a následně PCR reakce s primery F1/R1, F2/R2, F3/R3, F4/R4, F5/R5 a F6/R6 odvozenými od izolátu ACLSV P863 (Acc. No. M58152) ze švestky (Niu a kol. 2012). Získané PCR produkty jednotlivých izolátů byly separovány elektroforézou. PCR amplifikací reverzního transkriptu izolátu 153 se podařilo amplifikovat 3 segmenty z 6 možných, amplikony byly získány pomocí primerů F1/R1, F2/R2 a F3/R3. V případě izolátu 154 se podařilo amplifikovat 4 segmenty z 6, konkrétně amplikony byly získány pomocí primerů F1/R1, F2/R2, F3/R3 a F6/R6, které byly vybrány pro další práci. U izolátu 155 bylo získáno 5 PCR produktů, amplikony byly získány pomocí primerů F1/R1, F2/R2, F3/R3, F4/R4 a F6/R6, jak je uvedeno v tabulce č. 8.

Tabulka 8: Získané PCR produkty

Primer	Izolát 153	Izolát 154	Izolát 155
F1	+	+*	+
R1			
F2	+	+	+*
R2			
F3	+	+	+
R3			
F4	-	-	+
R4			
F5	-	-	-
R5			
F6	-	+	+*
R6			

(+) = PCR produkt; (-) = PCR produkt nebyl získán; \* = PCR produkty, které byly amplifikovány také Veronikou Ševčíkovou.

Obrázek 4: Elektroforetogram PCR amplifikace reverzního transkriptu s primery F6R6



1 = Marker Generuler 100bp +; 2 = izolát 153, nebyl pozorován PCR produkt; 3 = izolát 154; 4 = izolát 155.

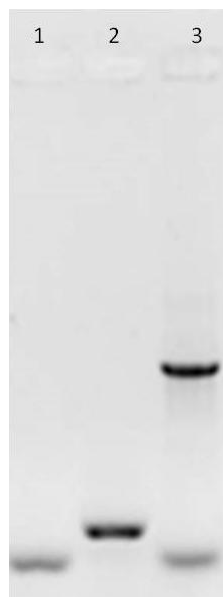
Délka nukleotidové sekvence byla odhadnuta pomocí markeru GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder po ukončení elektroforetické separace, délka PCR produktů F1R1 a F6R6 odpovídala přibližně 1250 nt. V případě PCR produktu F2R2 a F3R3 byla odhadnuta délka 1500 nt. Přesné délky sekvencí byly ověřeny při zpracovávání sekvenčních dat a bylo zjištěno, že odpovídaly očekávaným délkám, jak je uvedeno v tabulce č. 9.

Tabulka 9: Délka získaných PCR produktů

Použité primery	F1/R1	F2/R2	F3/R3	F6/R6
Očekávaná velikost získaných PCR produktů [nt]	1281	1482	1364	1218
Odhadovaná velikost PCR produktů [nt]	1250	1500	1500	1250
Zjištěná velikost získaných PCR produktů [nt]	1281	1482	1364	1218

Získané PCR produkty byly vyizolovány z gelu a zaklonovány do bakteriálních plazmidů pGEM - T easy. Pro zaklonování do bakterií byly vybrány ty PCR produkty, kterých bylo dostatečné množství. Ze vzorku 153 nebyl použit žádný PCR produkt pro ligaci do plazmidu. Ze vzorku 154 byly vybrány PCR produkty 154\_F1R1, 154\_F2R2, 154\_F3R3 a 154\_F6R6. Ze vzorku 155 byly pro ligaci do plazmidu vybrány produkty 155\_F1R1, 155\_F2R2, 155\_F4R4 a 155\_F6R6. Byla provedena kontrola naklonovaného produktu PCR reakcí s primery M13F a M13R. Úspěšně byly naklonovány produkty 154\_F1R1, 154\_F2R2, 154\_F3R3 a 154\_F6R6. V případě izolátu 155 byly úspěšně naklonovány produkty 155\_F1R1, 155\_F2R2, 155\_F6R6. Fragменты 155 amplifikované s primery F4R4 nebyly získány, obrázek č. 5 dokazuje neúspěšnou ligaci 154\_F4R4 segmentu do plazmidu.

Obrázek 5: Elektroforetogram PCR produktů Colony PCR s primery M13, vzorek 155\_F4R4



1 = PCR produkt 154\_R3F3; 2 = PCR produkt 155\_F4R4; 3 = PCR produkt 154\_R6F6.

PCR produkty získané amplifikací s primery M13 byly označeny pro sekvenování pomocí kitu BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1. Výsledky sekvenování byly následně editovány v programu Seqman a spojeny do kontigů, které byly analyzovány v programu BLAST pro zjištění identity samotné sekvence a také pro nalezení sekvencí s nejvyšší procentuální



identitou, ty jsou uvedeny v tabulce č. 10. Všechny čtyři sekvence 154\_F1R1 vykazovaly nejvyšší identitu 86 % se sekvencí slivoňového izolátu ACLSV P863 (Acc. M58152). Všechny tři sekvence 154\_F2R2\_28 vykazovaly nejvyšší identitu 86 % se sekvencí jabloňového izolátu ACLSV B6 (Acc. AB326224). Sekvence 154\_F2R2\_28 vykazovala se sekvencí izolátu ACLSV B6 identitu 77 % a sekvence 154\_F2R2\_29 a 154\_F2R2\_30 vykazovaly identitu 76 % se sekvencí izolátu ACLSV B6 (Acc. AB326224). Sekvence 154\_F3R3 vykazovaly nejvyšší procentuální identitu s izoláty Z1 (Acc. JN634760), MS (Acc. KC847061) a P863 (Acc. M58152) Sekvence 154\_F3R3\_37 a sekvence izolátu ACLSV Z1 (Acc. JN634760) vykazovaly identitu 83 %. Sekvence 154\_F3R3\_38 vykazovala identitu 85 % se sekvencí izolátu B6 (Acc. AB326224). Sekvence 154\_F3R3\_39 vykazovala identitu 82 % se sekvencí izolátu ACLSV MS (Acc. KC847061). Sekvence 154\_F3R3\_127 vykazovala identitu 82 % se sekvencí ACLSV P863 (Acc. M58152). Všechny tři sekvence 154\_F6R6 vykazovaly nejvyšší identitu 83 % se sekvencí izolátu ACLSV GC10a (Acc. AB520992). Variabilita mezi nukleotidovými sekvencemi izolátu ACLSV\_154 a sekvencemi ostatních izolátů ACLSV byla vysoká a pohybovala se v rozmezí 14 % - 24 %.

Tabulka 10: Procentuální identita získaných sekvencí s izoláty ACLSV zjištěná pomocí programu BLAST.

Kombinace primerů			
F1R1	F2R2	F3R3	F6R6
Pozitivní kolonie a identita klonovaných fragmentů se sekvencemi v databázi GeneBank			
154_F1R1_1 (P863/86 %)	154_F2R2_28 (B6/77 %)	154_F3R3_37 (Z1/83 %)	154_F6R6_14 (GC10a /83 %)
154_F1R1_2 (P863/86 %)	154_F2R2_29 (B6/76 %)	154_F3R3_38 (B6/85 %)	154_F6R6_16 (GC10a /83 %)
154_F1R1_4 (P863/86 %)	154_F2R2_30 (B6/76 %)	154_F3R3_39 (MS /82 %)	154_F6R6_19 (GC10a /83 %)
154_F1R1_5 (P863/86 %)		154_F3R3_127 (P863/82 %)	

Se získanými sekvencemi byl proveden mnohačetný alignment, na jehož základě byla zjištěna variabilita mezi sekvencemi získanými z jednotlivých bakteriálních kolonií. Mezi sekvencemi 154\_F1R1\_5 a 154\_F1R1\_4 bylo 19 nukleotidových záměn. Mezi

sekvencemi 154\_F1R1\_5 a 154\_F1R1\_2 bylo 21 záměn a mezi sekvencemi 154\_F1R1\_5 a 154\_F1R1\_1 bylo také 21 záměn. Mezi sekvencemi 154\_F1R1\_2 a 154\_1\_4 bylo 10 nukleotidový záměn, stejný počet záměn byl mezi sekvencemi 154\_F1R1\_1 a 154\_F1R1\_4. Sekvence 154\_F1R1\_1 a 154\_F1R1\_2 byly identické. Počet záměn mezi sekvencemi 154\_F1R1 je uveden v tabulce č. 11.

Tabulka 11: Počet nukleotidových záměn mezi sekvencemi 154\_F1R1

Sekvence	154_F1R1_1	154_F1R1_2	154_F1R1_4	154_F1R1_5
154_F1R1_1	0	0	10	21
154_F1R1_2		0	10	21
154_F1R1_4			0	19
154_F1R1_5				0

Po provedení mnohačetného alignmentu nukleotidových sekvencí 154\_F2R2\_28, 154\_F2R2\_29 a 154\_F2R2\_30 v programu Mega 7 bylo mezi sekvencemi 154\_F2R2\_28 a 154\_F2R2\_29 9 nukleotidových záměn. Stejný počet záměn byl mezi sekvencemi 154\_F2R2\_28 a 154\_F2R2\_30. Sekvence 154\_F2R2\_29 a 154\_F2R2\_30 byly identické. Počet záměn mezi sekvencemi 154\_F2R2 je uveden v tabulce č. 12.

Tabulka 12: Počet nukleotidových záměn mezi sekvencemi 154\_F2R2

Sekvence	154_F2R2_28	154_F2R2_29	154_F2R2_30
154_F2R2_28	0	9	9
154_F2R2_29		0	0
154_F2R2_30			0

Po provedení mnohočetného alignmentu v programu Mega 7 bylo mezi sekvencemi 154\_F3R3\_39 a 154\_F3R3\_38 zjištěno 183 záměn, mezi sekvencemi 154\_F3R3\_39 a 154\_F3R3\_37 bylo 229 záměn. Mezi sekvencemi 154\_F3R3\_39 a 154\_F3R3\_127 bylo 234 záměn. Mezi sekvencemi 154\_F3R3\_38 a 154\_F3R3\_127 bylo 10 záměn, mezi sekvencemi 154\_F3R3\_38 a 154\_F3R3\_37 bylo 7 záměn. A mezi sekvencemi 154\_F3R3\_37 a 154\_F3R3\_127 byly 3. Počet záměn mezi sekvencemi 154\_F3R3 je uveden v tabulce č. 13.

Tabulka 13: Počet nukleotidových záměn mezi sekvencemi 154\_R3F3

Sekvence	154_F3R3_37	154_F3R3_38	154_F3R3_39	154_F3R3_127
154_F3R3_37	0	7	229	3
154_F3R3_38		0	183	10
154_F3R3_39				234
154_F3R3_127				0

Po provedení mnohočetného alignmentu v programu Mega 7 byly mezi sekvencemi 154\_F6R6\_16 a 154\_F6R6\_19 a 154\_F6R6\_14, 154\_F6R6\_19 nalezeny 4 záměny. Mezi sekvencemi 154\_F6R6\_14 a 154\_F6R6\_16 bylo 8 záměn. Počet záměn mezi sekvencemi 154\_F6R6 je uveden v tabulce č. 14.

Tabulka 14: Počet nukleotidových záměn mezi sekvencemi 154\_F6R6

Sekvence	154_F6R6_14	154_F6R6_16	154_F6R6_19
154_F6R6_14	0	8	4
154_F6R6_16		0	4
154_F6R6_19			0

Pomocí programu Mega 7 byla zjištěna procentuální identita jednotlivých sekvencí získaných z bakteriálních kolonií s referenčním genomem, kterým byla nukleotidová sekvence izolátu P863 (Acc. NC001409). Pro sestavení sekvence ORF1 ACLSV byly vybrány ty sekvence, které vykazovaly vysokou procentuální identitu s nukleotidovou sekvencí referenčního genomu. Sekvence 154\_F1R1\_2 vykazovala identitu 86 % s referenčním genomem. Identita sekvence 154\_F2R2\_28 s referenčním genomem byla 71,3 %. Sekvence 154\_F3R3\_37 vykazovala se sekvencí referenčního genomu identitu 82,6 %. Pro ORF2 a ORF3 byla vybrána sekvence 154\_F6R6\_16, která vykazovala identitu 80 % s referenčním genomem. Procentuální hodnoty identity mezi sekvencemi 154\_F1R1, 154\_F2R2, 154\_F3R3, 154\_F6R6 a sekvencí referenčního genomu jsou uvedeny v tabulce č. 15.

Tabulka 15: Procentuální identita získaných sekvencí s referenčním genomem

Sekvence 154_F1R1	Identita s referenčním genomem [%]
154_F1R1_1	86
154_F1R1_2	86
154_F1R1_4	85,9
154_F1R1_5	83,6
Sekvence 154_F2R2	Identita s referenčním genomem [%]
154_F2R2_28	71,3
154_F2R2_29	71,2
154_F2R2_30	71,2
Sekvence 154_F3R3	Identita s referenčním genomem [%]
154_F3R3_37	82,6
154_F3R3_38	82,8
154_F3R3_39	82,2
154_F3R3_127	82,4
Sekvence 154_F6R6	Identita s referenčním genomem [%]
154_F6R6_14	79,6
154_F6R6_16	80
154_F6R6_19	80

Identita = procentuální identita jednotlivých sekvencí s genomem NC014009; žluté zvýraznění jednotlivých = sekvence, které byly vybrány pro další práci.

Ze získaných sekvencí byly v programu Mega 7 složeny jednotlivé čtecí rámce ACLSV, z ORF1 byla získána sekvence dlouhá 3663 nt z celkových 5655 nt, což odpovídalo 64 % délky sekvence prvního otevřeného čtecího rámce. Sekvence odpovídající otevřenému čtecímu rámci 1 vykazovala největší sekvenční identitu 81 % a 82 % s nukleotidovými sekvencemi izolátů ACLSV B6 (Acc. AB326224) respektive P863 (Acc. M58152). Z ORF2 byla získána sekvence dlouhá 1218 nt z celkových 1381 nt, odpovídala 88,1 %, délky sekvence otevřeného čtecího rámce 2 a vykazovala největší sekvenční identitu 85% s nukleotidovou sekvencí izolátu ACLSV GC10a (Acc. AB520992). Z posledního čtecího rámce ORF3 byla získána sekvence o délce 288 nt z celkových 582 nt, což odpovídalo 49,5 % délky sekvence třetího otevřeného čtecího rámce a vykazovala největší identitu 86 % s nukleotidovou sekvencí izolátu ACLSV Be (Acc. AM709776). Délky získaných sekvencí a jejich procentuální identita s nukleotidovými sekvencemi izolátů ACLSV jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka 16: Délka skložených sekvencí jednotlivých čtecích rámců ACLSV a jejich procentuální identita se sekvencemi v databázi Genebank

Čtecí rámec	Získaná sekvence [nt]	Sekvence čtecího rámce [nt]	Izolát ACLSV s nejvyšší identitou: [%]
ORF1	3663	5655	B6, P863: 81, 82
ORF2	1218	1381	GC10a: 85
ORF3	288	582	Be: 86

B6 (Acc. AB326224); P863 (Acc. 58152); GC10a (Acc. AB520992); Be (Acc. AM709776)

Z prvního otevřeného čtecího rámce nebyla osekvenována sekvence posledních 1992 nukleotidů z důvodu neúspěšné amplifikace cílového segmentu. Z druhého otevřeného čtecího rámce nebyla ze stejného důvodu získána sekvence prvních 138 nukleotidů z 5' konce a také sekvence 27 nukleotidů z 3' konce. Z třetího čtecího rámce nebyla získána sekvence posledních 294 nukleotidů.

Sekvence nukleotidů byla přeložena do sekvence aminokyselin a byly vyhledávány záměny nukleotidů a aminokyselin mezi sekvencemi čtecích rámců ACLSV 154 a referenčním genomem. Mezi nukleotidovými a aminokyselinovými sekvencemi ORF1 izolátu 154 a sekvencemi referenčního genomu bylo 773 nukleotidových záměn a 178 aminokyselinových záměn. Mezi sekvencemi ORF1 a referenčním genomem bylo v porovnání s ostatními čtecími rámci největší množství nukleotidových i aminokyselinových záměn. Mezi sekvencemi nukleotidů a aminokyselin ORF2 izolátu 154 a referenčního genomu bylo 244 nukleotidových záměn oproti referenčnímu genomu, počet záměn aminokyselin byl 73. V porovnání se dvěma zbývajících sekvencemi byl počet aminokyselinových i nukleotidových záměn mezi ORF2 a referenčním genomem druhý nejvyšší. V ORF 3 bylo 50 nukleotidových a 16 aminokyselinových záměn oproti referenčnímu genomu. V případě získané části sekvence třetího čtecího rámce byl výskyt nukleotidových záměn nejnižší, sekvence tohoto čtecího rámce je ale nejkratší. Počty záměn nukleotidů a aminokyselin mezi získanými sekvencemi a sekvencemi referenčního genomu jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka 17: Počet nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi složenými sekvencemi jednotlivých čtecích rámců ACLSV a referenčním genomem

Čtecí rámeček	Záměny nt	Záměny ak
ORF1	773	178
ORF2	244	73
ORF3	50	16

Identita nukleotidových sekvencí ORF1 referenčního genomu a izolátu 154 sestaveného ze tří dílčích sekvencí byla 78,9 % a identita aminokyselinových sekvencí RdRp referenčního genomu a izolátu 154 byla 84,1 %.

Identita nukleotidových sekvencí ORF2 referenčního genomu a izolátu 154 byla 80 % a aminokyselinové sekvence "movement proteinů" referenčního genomu a izolátu 154 vykazovaly identitu 80,2 %. Nukleotidové sekvence ORF3 referenčního genomu a izolátu 154 vykazovaly identitu 82,6 % a identitu 81,8 % vykazovaly aminokyselinové sekvence plášťových proteinů referenčního genomu a izolátu 154.

Nejvyšší variabilitu nukleotidových sekvencí vykazoval druhý otevřený čtecí rámeček a nejnižší variabilitu nukleotidových sekvencí vykazoval třetí otevřený čtecí rámeček. Nejnižší variabilitu vykazovala aminokyselinová sekvence RdRp a nejvyšší variabilitu vykazovala aminokyselinová sekvence "movement proteinu". Procentuální identity mezi získanými sekvencemi a referenčním genomem jsou uvedeny v tabulce č. 18.

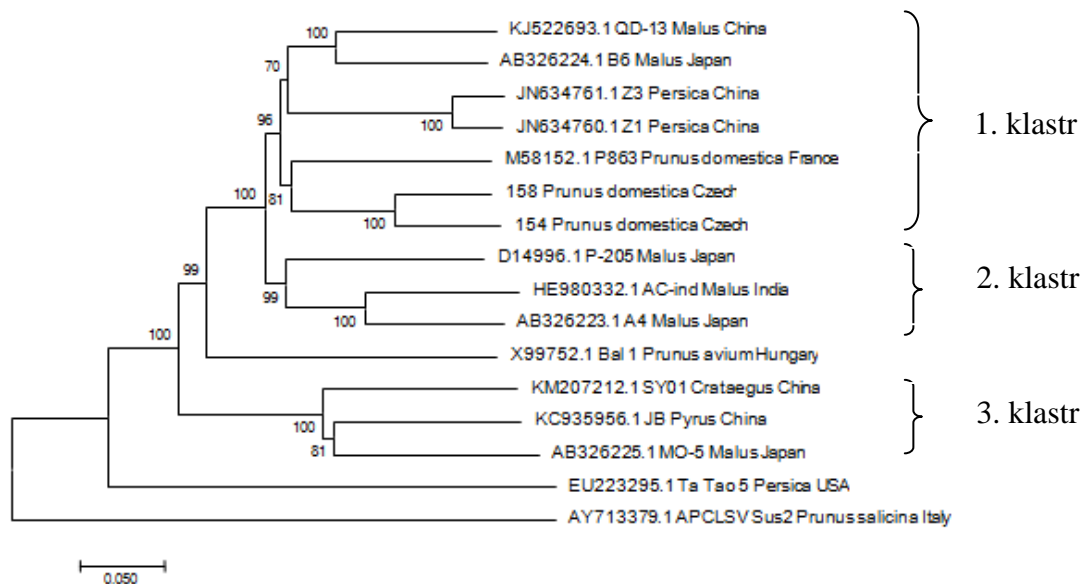
Tabulka 18: Procentuální identity sekvencí čtecích rámců izolátu 154 s referenčním genomem

Čtecí rámeček	Identita s referenčním genomem nt [%]	Identita s referenčním genomem ak [%]
ORF1	78,9	84,1
ORF2	80,0	80,2
ORF3	82,6	81,8

Nukleotidové a aminokyselinové sekvence izolátů 154, 158 a dalších vybraných izolátů ACLSV z Genebank databáze byly analyzovány metodou neighbor - joining. Izoláty ACLSV, jejichž nukleotidové sekvence ORF1 byly analyzovány, se rozdělily do 3 klastrů a dva izoláty se vyvětvily samostatně. Český izolát 154 se řadil do prvního klastru a vytvořil společnou větev se slivoňovým izolátem 158 z České republiky. První

klastr dále vytvořily slivoňové a jabloňové izoláty P863, QD13, Z1, Z3 a B6 z Francie, Číny a Japonska. Druhý klastr vytvořily izoláty P-205, A4 a AC-ind z Indie a Japonska, jejichž hostitelem byla jabloň. Třetí klastr vytvořily izoláty SY01, JB a MO-5 z Číny a Japonska, jejichž hostiteli byly hloh, hrušeň, a jabloň. Samostatné větve vytvořily slivoňové izoláty Bal 1 a Ta Tao 5 z Maďarska a z USA.

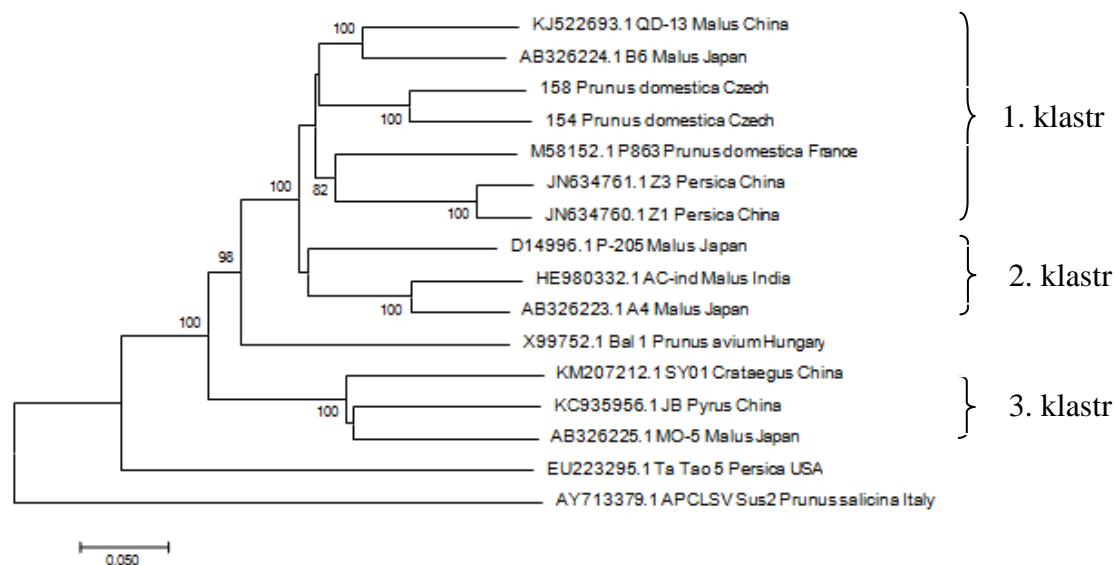
Obrázek 6: Fylogenetický strom ORF1 ACLSV(nt)



Jsou uvedeny "accession number" každého izolátu, označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Analyzované byly aminokyselinové sekvence proteinu RdRp izolátů ACLSV. Izoláty se rozdělily do tří klastrů, počet klastrů i zastoupení izolátů bylo stejné jako v případě sekvence nukleotidů. Izoláty 154, 158, P863, Z1, Z3 z prvního klastru se vyvětvily odlišně, jak lze vidět na obrázcích č. 6 a 7.

Obrázek 7: Fylogenetický strom ORF1 ACLSV (ak)

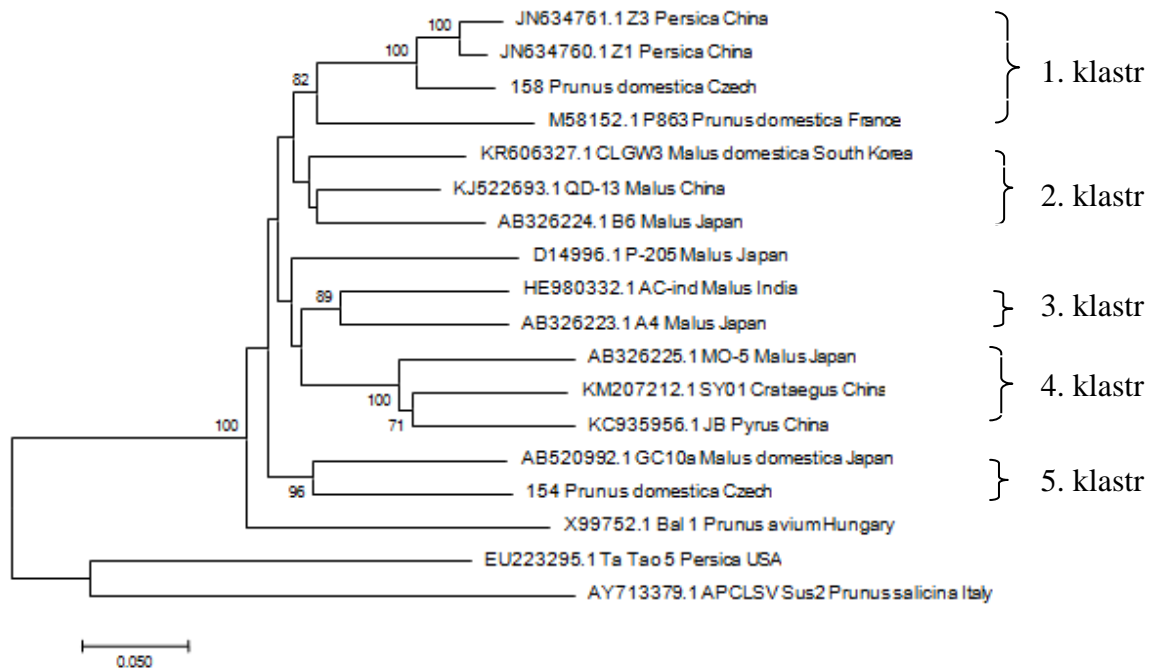


Pro každý izolát jsou uvedeny "accession number", označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Byly analyzovány nukleotidové sekvence ORF2 izolátů ACLSV a izoláty se rozdělily do pěti klastrů a tři izoláty se vyvětvily samostatně. Izolát 154 se řadil do pátého klastru a vytvořil společnou větev s izolátem GC10a. Slivoňové a jabloňové izoláty pátého klastru pocházely z České republiky a Japonska. První klast vytvořily slivoňové izoláty 158, P863, Z1 a Z3 z České republiky, Francie a Číny. Druhý klast vytvořily jabloňové izoláty QD-13 a B6 z Jižní Koreje a Japonska. Třetí klast vytvořily jabloňové izoláty AC-ind a A4 z Indie a Japonska. Čtvrtý klast vytvořily izoláty MO-5, SY01 a JB z Japonska a Číny, hostiteli byly jabloň, hloh a hrušeň. Samostatné větve vytvořily slivoňové izoláty: P-205, Bal 1 a Ta Tao z Japonska, Maďarska a USA.



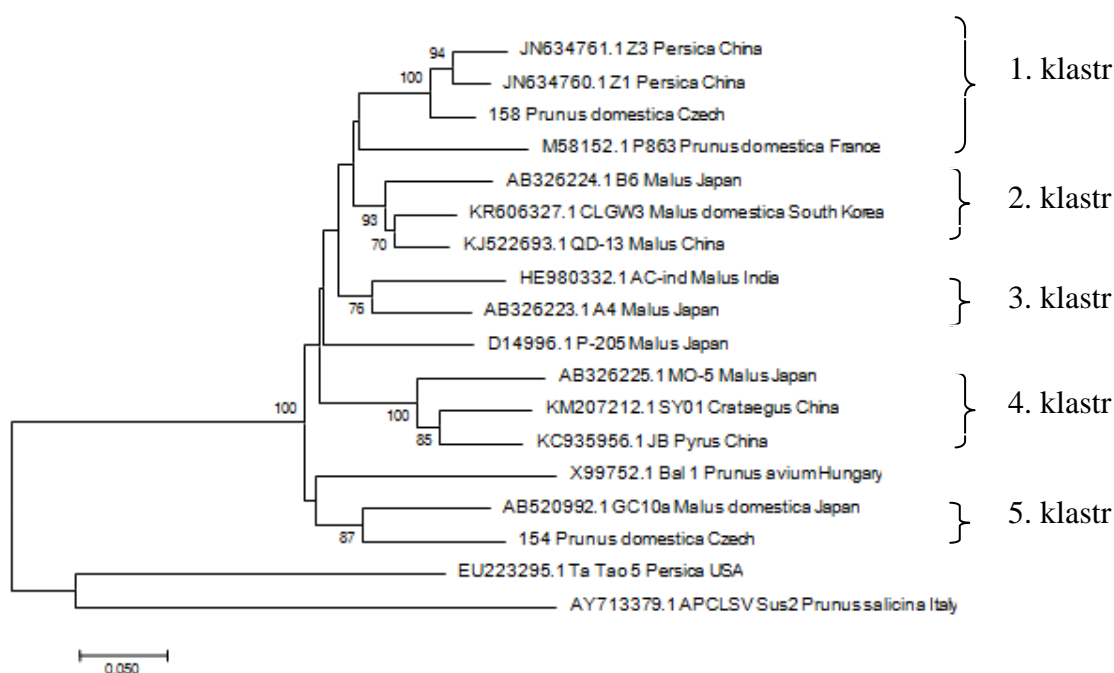
Obrázek 8: Fylogenetický strom ORF2 ACLSV (nt)



Jsou uvedeny "accession number" každého izolátu, označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Byly analyzovány aminokyselinové sekvence "movement proteinů" izolátů ACLSV. Izoláty se rozdělily do pěti klastřů, počet klastřů i zastoupení izolátů v jednotlivých klastrech bylo stejné jako v případě sekvence nukleotidů ORF2. Izoláty druhého klastru a izoláty P-205 a Bal 1 se vyvětvily odlišně, jak lze vidět na obrázcích č. 8 a 9.

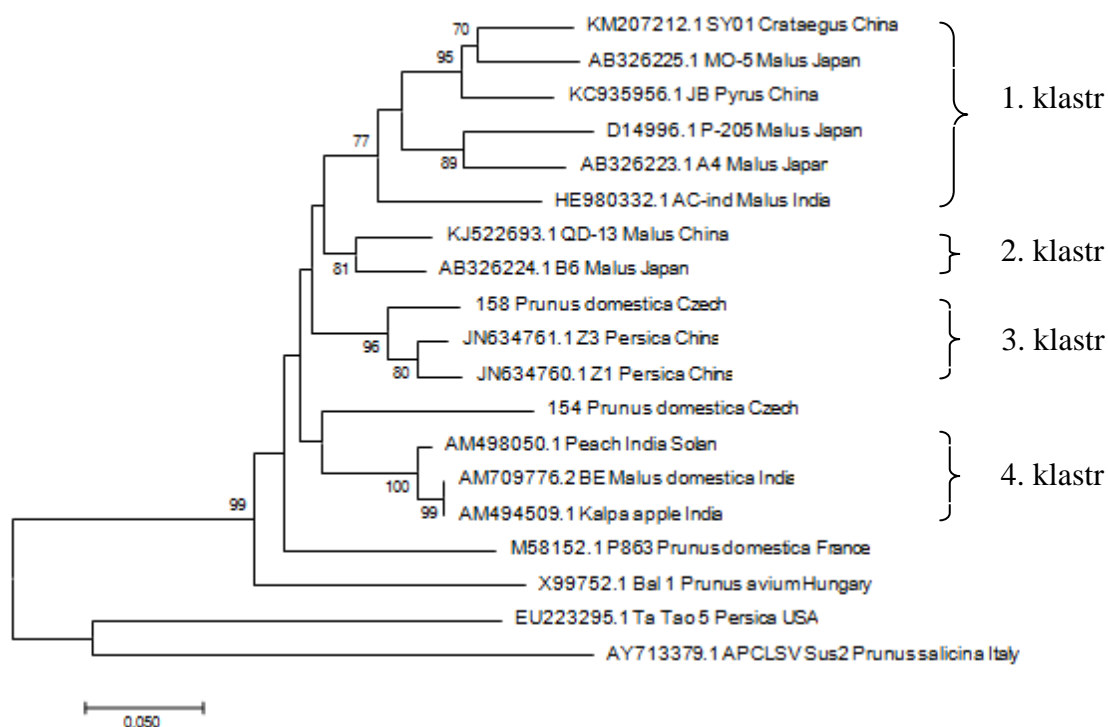
Obrázek 9: Fylogenetický strom ORF2 ACLSV (ak)



Jsou uvedeny "accession number" každého izolátu, označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Analyzovány byly nukleotidové sekvence ORF3 izolátů ACLSV. Izoláty se rozdělily do čtyř klastřů a samostatné větve vytvořily čtyři slivoňové izoláty 154, P863, Bal 1 a Ta Tao 5 z České republiky, Francie, Maďarska a USA. První klastř vytvořily izoláty MO-5, P-205, A4, SY01, JB a AC-ind z Japonska, Číny a Indie. Hostiteli byly jabloně, hloh a broskvoň. Druhý klastř vytvořily jabloňové izoláty B6 a QD-13 z Japonska a Číny. Třetí klastř vytvořily slivoňové izoláty Z1, Z3 a 158 z Číny a České republiky. Čtvrtý klastř vytvořily tři izoláty, jeden slivoňový a dva jabloňové BE a Kalpa z Indie.

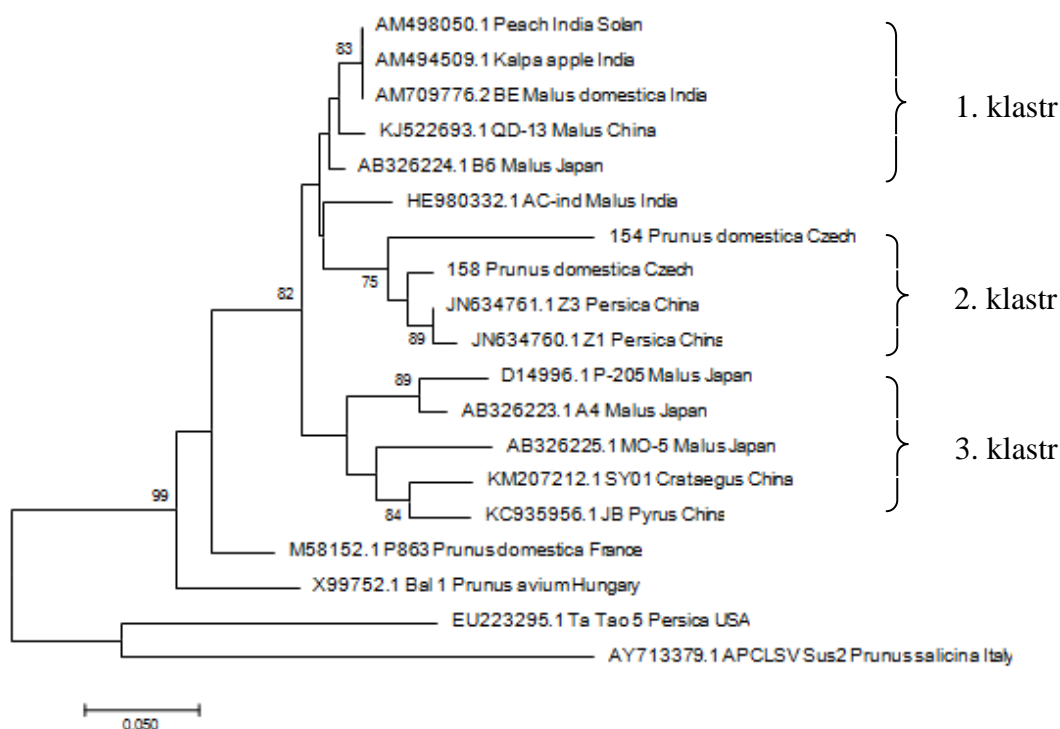
Obrázek 10: Fylogenetický strom ORF3 ACLSV (nt)



Jsou uvedeny "accession number" každého izolátu, označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Izoláty ACLSV se po analýze aminokyselinové sekvence plášťových proteinů rozdělily do tří klastrů. Počet klastrů i zastoupení izolátů v jednotlivých klastrech bylo odlišné od větvení kladogramu pro sekvenci nukleotidů ORF3, jak lze vidět na obrázcích č. 10 a 11. První klastř vytvořily izoláty (Acc. AM498050), Kalpa, BE, QD-13 a B6 z Indie, Číny a Japonska, hostiteli byly jabloň a slivoň. Druhý klastř vytvořily slivoňové a jabloňové izoláty 154, 158, Z1, Z3 a AC-ind z České republiky, Číny a Indie. Třetí klastř vytvořily izoláty P-205, A4, MO-5, SY01 a JB z Japonska a Číny. Hostiteli byly jabloň, hloh a slivoň. Samostatné větve vytvořily slivoňové izoláty Ta Tao, P863 a Bal 1 z USA, Francie a Maďarska.

Obrázek 11: Fylogenetický strom ORF3 ACLSV (ak)

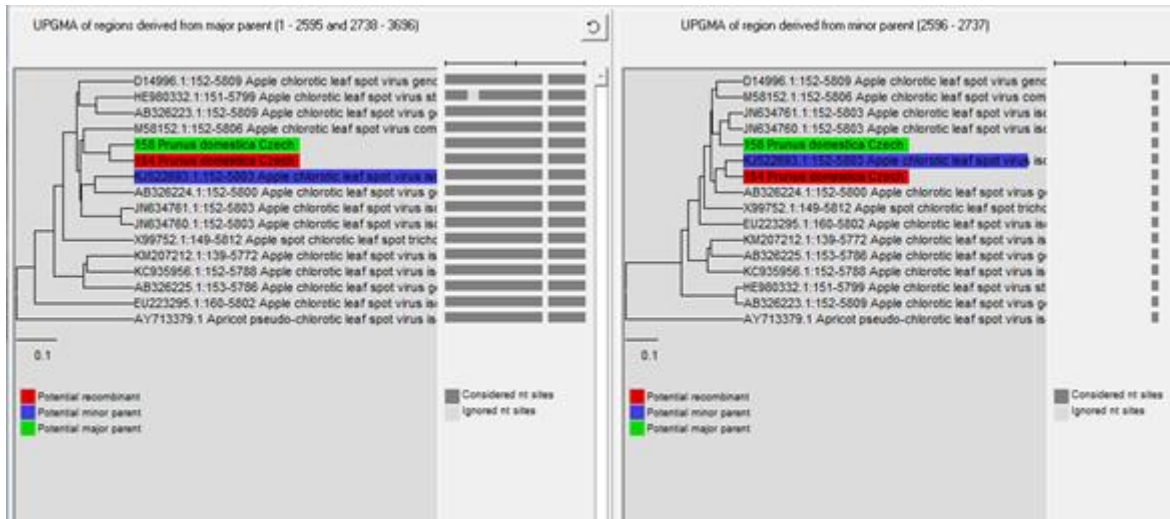


Jsou uvedeny "accession number" každého izolátu, označení izolátu, hostitelský druh a země původu. Měřítko představuje 0,05 substitucí na pozici. V kladogramu jsou zobrazeny hodnoty bootstrap 70 a vyšší. Jako outgroup byl zvolen Sus2.

Se sekvencemi výše zmíněných izolátů ACLSV zarovnanými do bloku byla provedena rekombinační analýza v programu RDP4. Nebyla nalezena žádná rekombinační událost mezi sekvencemi nukleotidů druhých a třetích otevřených čtecích rámců izolátu 154, 158 a odpovídajícími sekvencemi izolátů ACLSV získanými z databáze GENE BANK QD-13 (Acc. KJ522693), B6 (Acc. AB326224), Z1 (Acc. JN634760), Z3 (Acc. JN634761), GC10a (Acc. AB520992), P-205 (Acc. D14996), Ac-ind (Acc. HE980332), A4 (Acc. AB326223), Bal 1 (Acc. X99752), SY01 (Acc. KM207212), JB (Acc. KC935956), MO-5 (Acc. AB326225), Ta Tao 5 (Acc. EU223295), P863 (Acc. M58152), CLGW3 (Acc. KR606327), BE (Acc. AM709776), Kalpa (AM494509), a indický (AM498050). Mezi sekvencemi prvních otevřených čtecích rámců byla nalezena jedna potenciální rekombinace. Potenciální místa zlomu byla nalezena v pozicích 2595/2596 nt a 2837/2838 nt.

Jako hlavní předek byl určen čínský izolát QD-13 (Acc. KJ522693), jako minoritní předek potom český izolát 158 pocházející ze švestky domácí (obec Šumice).

Obrázek 12: Rekombinační analýza mezi izoláty ACLSV



## 11 Diskuze

Virus ACLSV má celosvětový areál rozšíření jak je uvedeno v kapitole 8.1 Geografické rozšíření ACLSV a široký okruh hostitelských druhů převážně z čeledi *Rosaceae* (Katsiani a kol. 2014). Izoláty 153, 154 a 155 pocházejí ze švestky domácí (*Prunus domestica*) pěstované na okraji obce Šumice. Mezi jednotlivými izoláty ACLSV se objevuje vysoká molekulární variabilita.

Plášťový protein má klíčový význam například pro infekčnost virových částic, interakci částic s replikačním aparátem buňky a modulaci symptomů (Callaway a kol. 2001; Thomas a kol. 2003; Lu a kol. 2004). Změny v aminokyselinách zařazených do primární struktury proteinu utvářejícího plášť viru mají vliv na rychlost elektroforetické separace plášťového proteinu. Z hlediska zastoupení aminokyselin proteinového pláště na pozicích 40, 59, 75, 130, a 184 můžeme izoláty ACLSV rozlišit do dvou skupin, tzv. klastrů B6 a P 205. Izolát 154 podobně jako izolát 158 (zpracovávaný Veronikou Ševčíkovou) nebylo možné přímo zařadit do jednoho z klastrů z důvodu aminokyseliny valin na pozici 59. Izolát 154 se nejvíce podobal klastru B6 díky aminokyselinám serin a tyrosin na pozicích 40 a 75. Z důvodu, že sekvence dlouhá 288 nukleotidů neodpovídala celé sekvenci pro plášťový protein viru, nebylo možné zjistit zastoupení aminokyselin na pozicích 130 a 184. Aminokyseliny serin a tyrosin byly zjištěny také u indického izolátu (Pasquini a kol. 1998; Yaegashi a kol. 2007; Rana a kol. 2008; Rana a kol. 2010).

Délka genomové RNA viru ACLSV je přibližně 7500 nt (German a kol. 1997; German a kol. 1990; Dhir a kol. 2013; Sato a kol. 1993; Marini a kol. 2008). Celogenomové sekvence izolátu 154 a referenčního genomu nemohly být porovnány. Proto byly porovnány pouze sekvence odpovídající částečným sekvencím jednotlivých otevřených čtecích rámců izolátu 154 a odpovídajících segmentů celogenomové referenční sekvence. Důvodem mohla být chyba při pipetování PCR reakce nebo PCR produktu do ligační směsi, malé množství templátu, špatné nasedání primerů atd. Sekvence nukleotidů odpovídající části otevřeného čtecího rámce 1 vykazovala identitu 78,9 % s referenčním genomem a neobsahovala přibližně 1992 nukleotidů z C' koncové oblasti. Sekvence aminokyselin proteinu RdRp izolátu 154 a referenčního genomu vykazovaly identitu 84,1 %. Sekvence odpovídající části ORF2 neobsahovala přibližně 138 nukleotidů N' koncové oblasti a přibližně 27 nukleotidů z C' koncové oblasti,

sekvence nukleotidů izolátu 154 s referenčním genomem vykazovaly identitu 80 %. Aminokyselinové sekvence "movement proteinu" vykazovaly identitu 80,2 %. Nukleotidová sekvence odpovídající části otevřeného čtecího rámce 3 neobsahovala 294 nukleotidů z C' koncové oblasti sekvence izolátu 154. Nukleotidové sekvence plášťového proteinu izolátu 154 a referenčního genomu vykazovaly identitu 82,6 %, aminokyselinové sekvence plášťového proteinu izolátu 154 a referenčního genomu vykazovaly identitu 81,8 %. Nejvyšší variabilita genomové sekvence ACLSV by měla odpovídat nukleotidové sekvenci kódující oblast "movement proteinu", variabilita sekvencí mezi izoláty ACLSV se pohybuje v rozmezí 15 % - 23 %. Sekvence nukleotidů, která kóduje "movement protein", vykazovala vysokou variabilitu 20 %. Sekvence aminokyselin "movement proteinu" izolátu 154 vykazovala nejvyšší variabilitu 19,8 %. Naopak nejkonzervovanějším proteinem je plášťový protein viru, jehož variabilita by se měla pohybovat v rozmezí 7 % - 13 %. Nukleotidová sekvence kódující plášťový protein izolátu 154 vykazovala nejnižší variabilitu 17,4 %. Aminokyselinová sekvence plášťového proteinu ale vykazovala variabilitu 18,2 %, která byla vyšší než variabilita aminokyselinové sekvence RdRp. Nukleotidová sekvence plášťového proteinu vykazovala variabilitu podobnou, ale vyšší než udávané rozmezí. Důvodem vyšší variability nukleotidových a aminokyselinových sekvencí plášťového proteinu může být chybějící oblast C' konce plášťového proteinu, N' koncová sekvence totiž vykazuje vyšší variabilitu. Sekvence nukleotidů RNA dependentní RNA polymeráza izolátu 154 vykazovala variabilitu 21,1 %, ale nejnižší variabilitu vykazovala sekvence aminokyselin RdRp 15,9 %. Variabilita nukleotidových i aminokyselinových sekvencí byla vysoká stejně jako v případě sekvence izolátu 158. Výše zmíněné hodnoty jsou srovnatelné s výsledky jiných prací. Guo zjistil identitu sekvencí pro "movement protein" a ta byla 65,9 % - 94 %, identita sekvencí jednotlivých izolátů kódujících plášťové proteiny byla 70,3 % - 95,9 % a 69,3 % - 91,8 % pro replikázový protein. Sekvence analyzované Dhirem vykazovaly identitu 80 % - 86 % pro "movement protein" a 90 % - 92 %, 75 % - 83 % pro plášťový protein, respektive RdRp. Aminokyselinové sekvence "movement protein", které analyzoval Marini, vykazovaly identitu 60 %. Aminokyselinové sekvence pro plášťový protein a RdRp vykazovaly identitu 72 % - 75,6% respektive 74 % - 75% (Pasquini a kol. 1998; Candresse a kol. 1995; Al Rwanih a kol. 2004; Marini a kol. 2008; Mathioudakis a kol. 2010; Dhir a kol. 2013; Guo a kol. 2016; Ševčíková 2016). K podobným závěrům došli také Sato a German (Sato a kol. 1993; German a kol. 1997).

Celkový počet nukleotidových a aminokyselinových záměn mezi získanou sekvencí pro ORF1 o délce 3663 nt a referenčním genomem byl 773, respektive 178. Záměn bylo v prvním čtecím rámci nejvíce. Tyto hodnoty mohly být ovlivněny velikostí sekvence pro první čtecí rámec, která je výrazně delší než zbývající dvě. Záměny nukleotidů i aminokyselin se mezi sekvencemi druhého otevřeného čtecího rámce a referenčního genomu vyskytovaly méně často než v sekvenci pro ORF1. Jejich počet byl 244 a záměn aminokyselin bylo 73. Nejnižší počet záměn nukleotidů i aminokyselin byl mezi získanými sekvencemi ORF3 a referenčním genomem, celkově 50 nukleotidových a 16 aminokyselinových záměn. Počet záměn mezi sekvencemi ORF2 a ORF3 izolátu 154 a referenčního genomu se výrazně neodlišoval od počtu záměn zjištěných Veronikou Ševčíkovou. Rozdíl byl patrný pouze mezi sekvencemi ORF1 a referenčním genomem. Počet záměn byl 773 v případě izolátu 154, respektive 1027 záměn v případě izolátu 158. Tento rozdíl je způsoben větší délkou sekvence ORF1 izolátu 158 (Ševčíková 2016).

Fylogenetickou analýzou provedenou se sekvencemi odpovídajícími částem jednotlivých otevřených čtecích rámců ACLSV byla zjištěna vysoká variabilita izolátů ACLSV. Jednotlivé kladogramy se větvy rozdílně ve srovnání s výsledky V. Ševčíkové (Ševčíková 2016). Při analýze nukleotidových a aminokyselinových sekvencí prvního čtecího rámce vytvářel izolát 154 první klast s izoláty z České republiky, Francie, Číny a Japonska. Vyšlo najevo, že nejpříbuznější s izolátem 154 je český izolát 158, francouzský izolát P 863 byl příbuzný s oběma českými izoláty. Při analýze aminokyselinových sekvencí izolátu ACLSV izolát P 863 blízkou příbuznost s českými izoláty nevykazoval. Při analýze nukleotidových a aminokyselinových sekvencí druhého otevřeného čtecího rámce vytvářel izolát 154 pátý klast s izolátem z Japonska. Nejpříbuznějším izolátem s českým izolátem 154 byl GC10a. V případě izolátu 158 byly nejpříbuznějšími izoláty Z1 a Z3, tedy stejné izoláty jako v případě dřívější práce zabývající se tímto izolátem (Ševčíková 2016). Při analýze nukleotidových sekvencí třetího čtecího rámce vytvářel izolát 154 čtvrtý klast s izoláty z Indie. Po provedení analýzy aminokyselinových sekvencí tohoto čtecího rámce vytvářel izolát 154 druhý klast s izoláty z České republiky a Číny, se kterými vykazoval příbuznost.

Stejně jako v případě práce Veroniky Ševčíkové utvářel americký izolát společnou větev s izolátem APCLSV z Itálie (outgroup), i v tomto případě se nejspíše jednalo o důsledek rekombinací v rámci čeledi *Betaflexiviridae* (Ševčíková 2016; Worobey a kol. 2000; Marais a kol. 2015). Větvení izolátu 158 a jeho nejpříbuznějších izolátů



Z1, Z3 a P 863 bylo podobné větvení zaznamenanému ve starší práci (Ševčíková 2016), větvení ostatních shodných izolátů ACLSV bylo odlišné.

Rekombinace a mutace jsou hlavními mechanismy evoluce RNA virů (Roossinck a kol. 1997). Mezi sekvencemi izolátu 154 a vybraných izolátů ACLSV z databáze GENE BANK bylo objeveno potenciální rekombinační místo na pozici 2596 nt a 2737 nt. Rekombinaci v ORF1 mezi izoláty ACLSV zjistil také Dhir (Dhir a kol. 2013).

## 12 Závěr

Byly získány kompletní sekvence jednotlivých čtecích rámců ACLSV ORF1 o délce 3663 nt, ORF2 o délce 1218 nt a 288 nt dlouhá sekvence ORF3. Byla prokázána variabilita nukleotidových i aminokyselinových sekvencí, která byla popsána už dříve. Při fylogenetické analýze byla prokázána příbuznost sekvencí jednotlivých čtecích rámců a proteinů izolátu 154 se sekvencemi izolátu 158 z České republiky (ORF1) a japonským izolátem GC10a (ORF2). Sekvence indických izolátů byly nejpodobnějšími s nukleotidovou sekvencí třetího otevřeného čtecího rámce, český izolát 158 byl nejpodobnější aminokyselinové sekvenci ORF3 izolátu 154. Bylo potvrzeno, že nukleotidová sekvence kódující plášťový protein vykazovala nejvyšší procentuální identitu s odpovídající nukleotidovou sekvencí referenčního genomu (Acc. NC001409). Sekvence aminokyselin RNA dependentní RNA polymerázy izolátu 154 vykazovala nejvyšší procentuální identitu s aminokyselinovou sekvencí RdRp izolátu P 863 (Acc. NC001409). Další možností pro výzkum českého izolátu 154 ACLSV by mohlo být získání chybějících sekvencí otevřených čtecích rámců a využití 3' Race PCR pro získání sekvencí 5' a 3' konce genomické RNA.

## 13 Seznam literatury

- Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., Brunt A. A., Candresse T., G. Foster D., Martelli G. P., Milne R. G., Fauquet C. M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-1060.
- Al Rwanih M., Turturo C., Minafra A., Saldarelli P., Myrta A., Pallás V., Savino V. (2004): Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology* 86: 117-122.
- Bar-Joseph M., Hull R., Lane L. C. (1974): Biophysical and biochemical characterization of *Apple Chlorotic Leafspot Virus*. *Virology* 62: 563-566.
- Bazzoni A., Tavano D., Didonna A., Savino V. (2010): Pathogenicity of ten isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* to *Prunus*. *Acta Horticulturae* 862: 507-514.
- Berna A., Briand J. P., Stussi-Garaud CH., Godefroy-Colburn T. (1986): Kinetics of accumulation of the three non-structural proteins of *Alfalfa mosaic virus* in tobacco plants. *Journal of General Virology* 67: 1135-114.
- Borisova A., Christov N. (2014): Detection of viruses infecting sweet cherry cultivars and elites at the Institute of Agriculture-Kyustendil, Bulgaria. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences* 6: 701-705.
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E. T., Sit T. L., Lommel S. A. (2001): The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39: 419-60.
- Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Macquaire, G., German, S., Dunez, J., Grasseau, N., Malinovsky, T. (1995): An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Acta Horticulturae* 386: 136-147.
- Cieślińska M., Malinowski T., Zawadzka B. J. (1995): Studies on several strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* ACLSV isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulturae* 386: 63-71.
- Cieślińska M. (2002): Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy. *Acta Horticulturae* 596: 481-484.

- Cieślińska M., Borisova A., Komorowska B. (2007a): Some molecular properties of several isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from Bulgaria. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 125-131.
- Cieślińska M. (2007b): Application of thermo-and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 15: 117-124.
- Cho I.-S., Igori D., Lim S., Choi G.-S., Hammond, J. Lim H.-S., Moon J.-S. (2016) Deep sequencing analysis of apple infecting viruses in Korea. *Plant Pathology Journal* 32: 441-451.
- Constable F. E., Joyce P. A., Rodoni B. C. (2007) A survey of key Australian pome fruit growing districts for exotic and endemic pathogens. *Australasian Plant Pathology* 36: 165-172.
- Desvignes J. C., Boyé R., (1989): Different diseases caused by the *Chlorotic leaf spot virus* on the fruit trees. *Acta Horticulturae* 235: 31-38.
- Dhir S., Zaidi A. A., Hallan V. (2013): Molecular characterization and recombination analysis of the Complete Genome of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of Phytopathology* 161: 704-712.
- Fan X. D., Zhang Z. P., Ren F., HU G. J., Zhou J., Li Z. N., Wang G., Dong Y. (2017): Occurrence and genetic diversity of *Grapevine berry inner necrosis virus* from grapevines in China. *Plant Disease* 101: 144-149.
- Gadiou S., Kundu J.K., Paunovic S., Garcia-Diez P., Komorowska B, Gospodaryk A., Handa A., Massart S., Birisik N., Takur P.D., Polischuk V. (2010): Genetic diversity of flexiviruses infecting pome fruit trees. *Journal of Plant Pathology* 92: 685-691.
- García-Ibarra A., Rubio M., Martínez-Gómez P. Dicentaa F. (2010): Pollen and seed transmission of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV) in apricot. *Acta Horticulturae* 862: 483-486.
- German S., Candresse T., Lanneau M., Huet J. C., Pernollet J. C., Dunez J. (1990): Nucleotide sequence and genomic organization of *Apple Chlorotic Leaf Spot Closterovirus*. *Virology* 179: 104-112.

- German S., Candresse T., Gall L. O., Lanneau M., Dunez J. (1992): Analysis of the dsRNA of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology* 73: 767-773.
- German-Retana S., Bergey B., Delbos R. P., Candresse T., Dunez J. (1997): Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of Virology* 142: 833-841.
- Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyová A., Candresse T., Olmos A. (2014): Molecular characterization of divergent *Grapevine Pinot gris virus* isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology* 159: 2103-2107.
- Gualandri V., Asquini E., Bianchedi P., Covelli L., Brilli M., Malossini U., Bragagna P., Saldarelli P., Si-Ammour A. (2017): Identification of herbaceous hosts of the *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). *European Journal of Plant Pathology* 147: 21-25.
- Godefroy-Colburn T., Gagey M. J., Berna A., Stussi-Garaud C. (1986): A Non - structural protein of *Alfalfa mosaic virus* in the walls of infected tobacco cells. *Journal of General Virology* 67: 2233-2239.
- Guo W., Zheng W., Wang M., Li X., Ma Y., Dai H. (2016): Genome sequences of three *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Hawthorns in China. *PLoS ONE* 11: 1-10.
- Ismaeil F., Al-Jabor K., Myrta A., Mando M. J., Al-Saadoun E., Hassan M., Al-Chaabi S. (2006): Viruses of pome fruit trees in Syria. *EPPO Bulletin* 36: 65-68.
- 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., Jelkmann W., Upton C. (2000): Nucleotide sequence and genome organisation of *Cherry mottle leaf virus* and its relationship to members of the *Trichovirus* genus. *Archives of Virology* 145: 995-1007.
- James D., Varga A., Croft H., Rast H., Thompson D., Hayes S. (2006): Molecular characterization, phylogenetic relationships, and specific detection of *Peach mosaic virus*. *Phytopathology* 96: 137-144.

- Ji Z., Zhao X., Duan H., Hu T., Wang S., Wang Y., Cao K. (2013): Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. *Acta virologica* 57: 435-441.
- Katsiania A. T., Maliogka V. I., Candresse T., Katis N. I. (2014): Host-range studies, genetic diversity and evolutionary relationships of ACLSV isolates from ornamental, wild and cultivated *Rosaceous* species. *Plant Pathology* 63: 63-71.
- Katwal V. S., Handa A., Thakur P. D., Tomar M. (2016): Prevalence and serological detection of apple viruses in Himachal Pradesh. *Plant Pathology Journal* 15: 40-48.
- Kinard G. R., Scott S. W., Barnett O. W. (1996): Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving* viruses using RT-PCR. *Plant disease* 80: 616-621.
- 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.
- Lehto K., Dawson W. O. (1990): Replication, stability, and gene expression of *Tobacco mosaic virus* mutants with a second 30K ORF. *Virology* 175: 30-40.
- 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: 420-426.
- Lister R. M. (1970): *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 30.
- Lolić B., Matić S., Đurić G., Hassan M., Di Serio F., Myrta A. (2010): Pome fruit viruses in Bosnia and Herzegovina. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 245-247.
- Lu R., Folimonov A., Shintaku M., Li W. X., Falk B. W., Dawson W. O., Ding S. W. (2004): Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 15742-15747.
- Mahfoudhi N., El Air M., Moujahed R., Salleh W., Djelouah K. (2013): Occurrence and distribution of pome fruit viruses in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 136-140.

- Malan S. S. (2015): The importance of planting certified trees that are free of *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV). Hortgro Science 70-71.
- Mandic B., Matic' S., Al Rwahnih M., Jelkmann W., Myrta A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. Journal of Plant Pathology 89: 103-108.
- Marini D. B., Gibson P. G., Scott S. W. (2008): The complete nucleotide sequence of an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica* (L.) Batch). Archives of Virology 153: 1003-1005.
- Martelli G. P., Candresse T., Namba S. (1994): *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. Archives of Virology 134: 451-455.
- Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F. Dolja V. V. (2007): Family *Flexiviridae*: A Case study in virion and genome plasticity. Annual Review of Phytopathology 45: 73-100.
- Mathioudakis M. M., Maliogka V. I., Katsiani A. T., Katis N. I. (2010): Incidence and molecular variability of *Apple stem pitting* and a *Apple chlorotic leaf spot viruses* in apple and pear orchards in Greece. Journal of Plant Pathology 92: 139-147.
- Mekuria T. A., Druffel K. L., Susaimuthu J., Eastwell K. C. (2013): Complete nucleotide sequence of a strain of *Cherry mottle leaf virus* associated with peach wart disease in peach. Archives of Virology 158: 2201-2203.
- Melcher U. (1990): Similarities between putative transport proteins of plant viruses. Journal of General Virology 71: 1009-1018.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. (2002): Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99: 81-92.
- Mushegian A. R., Koonin E. V.(1993): Cell-to-cell movement of plant viruses Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. Archives of Virology 133: 239-257.
- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., Martelli G. P. (2003): Virus diseases affecting the mediterranean stone fruit industry: a decade of surveys In: Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V.: Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. Options Mediterranée, Série B. Etudes et Recherches 45: 15-23.

- Nakahara K. S., Yoshida K., Suzaki K., Yoshikawa N., Tsutae I. (2011): Sensitive PCR-based detection of *apple chlorotic leaf spot virus* heterogenous in apple trees. Japan International Research Center for Agricultural Sciences 45: 411-421.
- Németh M. V., Posnette A. F. (1986): Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Niu F., Pan S., Wu Z., Jiang D., Li S. (2012): Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of *Apple chlorotic leaf spot virus* from peach (*Prunus persica*) in China. Archives of Virology 157: 783-786.
- Oldfield G. N., Creamer R., Osorio F., Rodriguez R., Perring T. M. (1995): Incidence and distribution of Peach mosaic and its vector, *Eriophyes insidiosus* (Acari: *Eriophyidae*) in Mexico. Plant Disease 79: 186-189.
- Ondrušíková E., Kudělková M., Pavelková R., Jana Moudrá J., Křížan B., Holleínová V. (2016): Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie in vitro. Mendelova univerzita, 2016.
- Pasquini F., Faggioli F., Pilotti M., Lumia V., Barba M. (1998): Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Italy. Acta Horticulturae 472: 195-202.
- Pavelková R., Kudělková M., Ondrusíková E., Eichmeier A. (2015): Virus Elimination in peach cv. 'Red Haven' by chemotherapy. Agricultural communications 3:16-20.
- Polák J., Svoboda J. (2006): The reliability of detection and the distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pears in the Czech Republic. Horticultural Science 33: 7-10.
- Polák J. (2007): Viruses of blackthorn and road-bordering trees of plum, myrobalan, sweet and sour cherries in the Czech Republic. Plant Protection Science 43: 1-4.
- Pūpola N., Moročko - Bičevska I., Kāle A., Zeltiņš A. (2011): Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. Journal of Plant Pathology 159: 597-605.
- Rana T., Chandel V., Hallan V., Zaidi A. A. (2008): Characterisation of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. Australasian Plant Disease Notes 3: 65-67.
- Rana T., Chandel V., Hallan V., Zaidi A. A. (2009): Molecular evidence for the presence of *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected peach trees in India. Scientia Horticulturae 120: 296-299.



- Rana T., Chandel V., Kumar Y., Ram R., Hallan V. Zaidi A. A. (2010): Molecular variability analyses of *Apple chlorotic leaf spot virus* capsid protein. *Journal of Biosciences* 35: 605-15.
- Roossinck M. J., Mechanisms of plant virus evolution (1997): *Annual Review of Phytopathology* 35: 191-209.
- Safarnejad M. R., Jouzani G. S., Meisam M., Twyman R. M., Schillberg S. (2011): Antibody-mediated resistance against plant pathogens. *Biotechnology Advances* 29: 961-971.
- Saldarelli P., Boscia D., De Stradis A., Vovlas C. (2008): A new member of the family *Flexiviridae* from *Phlomis fruticosa*. *Journal of Plant Pathology* 90: 281-286.
- Salem N., Mansour A., Al-Musa A. (2005): Viruses of pome fruit trees in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 87: 123-126.
- Salmon M. A., Vendrame M., Kummert 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. *Journal of Virological Methods* 104: 99-106.
- Sato K., Yoshikawa N., Takahashi T. (1993): Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology* 74: 1927-1931.
- Sato K., Yoshikawa N., Takahashi T., Hideharu T. (1995): Expression subcellular location and modification of the 50 kDa protein encoded by ORF2 of the *Apple chlorotic leaf spot trichovirus genome*. *Journal of General Virology* 76: 1503-1507.
- Satoh H., Matsuda H., Kawamura T., Isogai M., Yoshikawa N., Takahashi T. (2000): Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubuleinducing activity of the 50 kDa movement protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. *Journal of General Virology* 81: 2085-2093.
- Song Y., Hong N., Wang L., Hu H., Tian R., Xu W., Ding F., Wang G. (2011): Molecular and serological diversity in *Apple chlorotic leaf spot virus* from sand pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *European Journal of Plant Pathology* 130: 183-196.
- Svoboda J., Polák J. (2010): Metodika diagnostiky APMV, ACLSV a ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

- Su L., Bhagwat B., Bernardy M., Wiersma P. A., Cheng Z., Xiang Y. (2016): Molecular analysis of three new *Cherry mottle leaf virus* isolates reveals intra - species genetic diversity and inter-species gene transfer. *Phytoparasitica* 44: 571-574.
- Ševšíková V. (2016): Molekulární charakteristika *Apple chlorotic leaf spot virus*. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- Thomas C. L., Leh V., Lederer C., Maule A. J. (2003): *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306: 33-41.
- Ulubas Ç., Ertunç F. (2005): *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV)* Status in Turkey and Sensitive Detection Using Advanced Techniques. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 251-257.
- Yaegashi H., Isogai M., Tajima H., Sano T., Yoshikawa N. (2007): Combinations of two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* are crucial for infectivity. *Journal of General Virology* 88: 2611-2618.
- Yoshikawa N., Takahashi T. (1988): Properties of RNAs and proteins of *Apple stem grooving* and *Apple chlorotic leaf spot viruses*. *Journal of General Virology* 69: 241-245.
- Yoshikawa N., Iida H., Goto S., Magome H., Takahashi T., Terai Y. (1997): *Grapevine berry inner necrosis*, a new trichovirus: comparative studies with several known trichoviruses. *Archives of Virology* 142: 1351-1363.
- Yoshikawa, N. (2001): *Apple chlorotic leaf spot virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses 386.
- Wang L., Wang G., Hong N., Tang R., Deng X., Zhang H. (2006): Effect of thermotherapy on elimination of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* for in vitro-cultured pear shoot tips. *Horticultural Science* 41: 729-732.
- Watpade S., Raigond B., Thakur P. D., Handa A., Pramanick K. K., Sharma Y. P., Tomar M. (2012): Molecular detection of latent *Apple chlorotic leaf spot virus* in elite mother plants of apple. *Indian Journal of Virology* 23: 359-363.
- Wu Z. B., Ku H. M., Chen Y. K., Chang C. J. (2010): Biological and Molecular Characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* Causing Chlorotic Leaf Spot on Pear (*Pyrus pyrifolia*) in Taiwan. *Horticultural Science* 45: 1073-1078.

### **13.1 Internetové zdroje**

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [online] [cit. 17.7.2017].

Dostupné

z:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?term=ACLSV+AND+\(\(%226000%22%5BSLEN%5D+%3A+%228000%22%5BSLEN%5D\)\)&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?term=ACLSV+AND+((%226000%22%5BSLEN%5D+%3A+%228000%22%5BSLEN%5D))&cmd=DetailsSearch)

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [online]. Copyright © 2017, International Committee on Taxonomy of Viruses [cit. 17.07.2017]. Dostupné z: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>