

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Michaela Martinusíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Cherry virus A

Bakalářská práce

Michaela Martinusíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Šafářové, PhD. za cenné rady a připomínky, odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování bakalářské práce a za pomoc při získávání výsledků experimentální části.

Souhrn

Cherry virus A (CVA) náleží do rodu *Capillovirus* a čeledi *Flexiviridae*. Poprvé byl popsán v roce 1995 dr. Jelkmannem na višni (*Prunus cerasus* L.) v Německu. Přirozeně infikuje nejčastěji třešně (*Prunus avium* L.) a višně, ale byl zjištěn i u dalších peckovin, kterými jsou švestky (*Prunus domestica* L.), mirabelky (*Prunus insititia* L.), broskvoně (*Prunus persica* L.), nebo japonské meruňky (*Prunus mume* L.). *Cherry virus A* je široce rozšířen v Evropě, Severní Americe a Asii. Prozatím nebylo prokázáno, že by na rostlinách vyvolával viditelné příznaky infekce, ale ve směsné infekci s dalšími viry může zesilovat závažnost symptomů a tím i ovlivnit kvalitu produkce ovoce. Tento virus se přenáší pouze roubováním.

Cherry virus A je (+)ssRNA neobalený, vláknitý virus s velikostí virionu 640 – 700 x 12 nm. Genom je organizován do dvou překrývajících se čtecích rámců (ORFs). ORF1 kóduje RdRp polymerázu a plášťový protein. ORF2 kóduje 'movement' protein. Pro detekci CVA se používají molekulární metody založené na RT-PCR nebo dot-blot hybridizaci.

Experimentální část byla zaměřena na detekci přítomnosti *Cherry virus A* (CVA) a *Little cherry virus-1* (LChV-1) v souboru vzorků třešní a višní českého původu. Pomocí RT-PCR za použití 'reverze' primeru pro tvorbu cDNA a kombinaci primerů CVA-fw1 / CVA-rev1 pro PCR amplifikaci, byla prokázána přítomnost CVA v 30,77 % vzorků. Pro detekci LChV-1 byla použita také metoda RT-PCR, za použití LCV3EC primeru pro syntézu cDNA a kombinace primerů LCV1U16390 / LCV1L16809 pro PCR amplifikaci. Přítomnost LChV-1 ve vzorcích nebyla prokázána.

Summary

Cherry virus A (CVA) belongs to the genus Capillovirus and family Flexiviridae. It was first described in 1995 dr. Jelkmannem on sour cherries (*Prunus cerasus* L.) in Germany. Naturally, most often infects sweet cherries (*Prunus avium* L.) and sour cherries, but was found also in other stone fruit, which are plum (*Prunus domestica* L.), mirabelle plum (*Prunus insititia* L.), peach (*Prunus persica* L.) and Japanese apricot (*Prunus mume* L.). Cherry virus A is widespread in Europe, North America and Asia. So far no evidence that the plants induced visible symptoms of infection, but in mixed infection with other viruses may increase the severity of symptoms and thus affect the quality of fruit production. The virus is transmitted only by grafting. *Cherry virus A* is (+) ssRNA uncoated, fibrous virus with a virion size 640-700 x 12 nm. The genome is organized into two overlapping open reading frames (ORFS). ORF1 encodes RdRp polymerase and coat protein. ORF2 encodes a movement protein. For the detection of CVA are used molecular methods based on RT-PCR or dot-blot hybridization.

Experimental part was focused on detecting the presence of *Cherry virus A* (CVA) and *Little cherry virus-1* (LChV-1) in the symplex sečet and sour cherries Czech origin. Using RT-PCR, using reverse primer to create cDNA and primer combination fw1-CVA / CVA-rev1 PCR amplification was demonstrated by the presence of CVA in 30.77% of samples. For LChV-1 detection method was also used RT-PCR, using primers for the synthesis LCV3EC cDNA and primer combinations LCV1U16390 / LCV1L16809 for PCR amplification. The presence LChV-1 in the samples was not demonstrated.

Obsah

1.	Cíle práce	9
2.	Úvod	10
3.	<i>Cherry virus A (CVA)</i>	11
3.1	Taxonomické zařazení CVA	11
3.1.1	Charakteristika čeledi <i>Flexiviridae</i>	11
3.1.2	Charakteristika rodu <i>Capillovirus</i>	12
3.2	Geografické rozšíření CVA	13
3.3	Biologické vlastnosti CVA	13
3.3.1	Hostitelský okruh	13
3.3.2	Příznaky infekce	14
3.3.3	Ovlivnění výnosu po infekci	15
3.3.4	Způsob přenosu	16
3.4	Molekulární vlastnosti CVA	16
3.4.1	Morfologie virionů CVA	16
3.4.2	Nukleová kyselina	17
3.4.3	Proteiny	17
3.4.4	Lipidy	17
3.4.5	Charakteristika genomu CVA	17
3.5	Genomová variabilita CVA	19
3.6	Detekce a identifikace CVA	20
3.6.1	Sérologické metody	20
3.6.2	Molekulární metody	20
3.6.3	Elektronová mikroskopie	23
3.6.4	Frekvence CVA infekce	23
4.	Experimentální část	25
4.1	Materiál a metody	25
4.1.1	Biologický materiál	25
4.1.2	Reverzní transkripce (RT)	25
4.1.2.1	Reakční směs RT	25
4.1.2.2	Podmínky a provedení reverzní transkripce	26
4.1.3	Polymerázová řetězová reakce	26

4.1.3.1	Reakční směs pro PCR amplifikaci	26
4.1.3.2	Podmínky PCR reakce	27
4.1.3.3	Vyhodnocení PCR amplifikace, detekce PCR produktů	28
4.2	Výsledky a diskuze	28
4.2.1	<i>Cherry virus A</i> (CVA)	28
4.2.2	<i>Little cherry virus-1</i> (LChV-1)	30
5.	Závěr	32
6.	Seznam použité literatury	33
7.	Seznam použitých zkratk a symbolů	35
8.	Přílohy	37

1. Cíle práce

- 1) Vypracování literární rešerše na téma *Cherry Virus A (Flexiviridae)*, významný patogen peckovin.
- 2) Detekce viru *Cherry virus A (CVA)* ve vzorcích peckovin.

2. Úvod

Virové infekce jsou činitelem, který způsobuje hospodářským rostlinám velké škody. Rod *Capillovirus* je významnou skupinou rostlinných virů, do níž patří i *Cherry virus A* (CVA), který infikuje dřeviny r. *Prunus*, často ve směsné infekci s dalšími viry. Právě tyto směsné infekce mohou způsobit velké problémy v komerčních sadech peckovin a ovlivnit tak jejich výnos.

Teoretická literární část této práce shrnuje celkové poznatky a informace o *Cherry virus A*. Experimentální část je zaměřena na detekci *Cherry virus A* a *Little cherry virus-1* ve 26 kultivarech třešní a višně pomocí metody RT-PCR.

3. Cherry virus A (CVA)

3.1 Taxonomické zařazení CVA

Cherry virus A (CVA) byl poprvé popsán v Německu dr. Jelkmannem, který také navrhl jeho taxonomické zařazení do rodu *Capillovirus* (Jelkmann, 1995). Jako platný druh byl CVA ustanoven v roce 1998 (ICTVdB, 2006). Rod *Capillovirus* byl později zařazen do čeledi *Flexiviridae* (Adams a kol., 2004; Marais a kol., 2008).

Druh je obecně vymezen třemi základními kritérii. Prvním kritériem je přirozené spektrum hostitelů, druhým kritériem je sérologická specifita (všechny známé druhy nejsou sérologicky příbuzné) a posledním kritériem vymežující rodu *Capillovirus* je nukleotidová identita menší než 72 % v sekvenci genu nebo menší než 80% aminokyselinová identita v sekvenci plášťového proteinu (CP), nebo RdRp polymerázy (ICTVdB, 2006). Kritériem pro vymezení jednotlivých druhů v rámci rodu je aminokyselinové sekvence plášťového proteinu a 'movement' proteinu větší než 10 %.

3.1.1 Charakteristika čeledi *Flexiviridae*

Čeď *Flexiviridae* zahrnuje (+)ssRNA viry a je pojmenována podle vláknitého tvaru virionu jejích zástupců. Taxonomicky byla tato čeď ustanovena v roce 2004 (ICTVdB, 2006). Čeď *Flexiviridae* byla vytvořena na základě podobností v morfologii virové částice, organizace genomu a fylogenetických vztahů stanovenými na základě variability genů kódujících replikační a strukturní proteiny (Adams a kol., 2004).

Tato čeď obsahuje 9 rodů, *Allexivirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Mandarivirus*, *Potexvirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus* a prozatímně je zde zařazený i rod *Citrivirus*. Jednotlivé rody se liší délkou virionu, velikostí genomu, velikostí plášťového proteinu, počtem čtecích rámců a velikostí proteinu kódujícího virovou polymerázu (Martelli a kol., 2007).

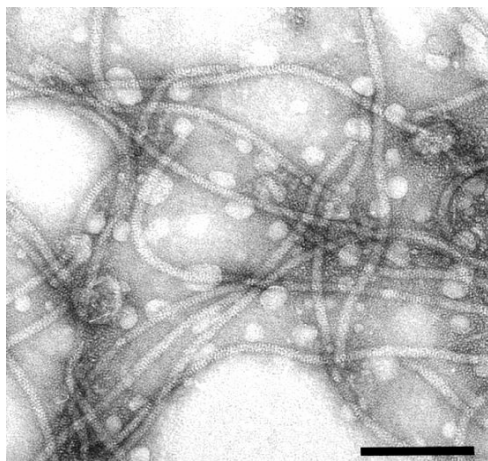
Zástupci čeledi *Flexiviridae* infikují většinou omezený okruh hostitelů. V závislosti na rodu a druhu infikují především dvouděložné rostliny a dřeviny (Adams a kol., 2004). Jednotliví zástupci této čeledi se přenášejí hlavně mechanicky nebo někteří vegetativně, pomocí infikovaných cibulek, oddenků a hlíz. (Martelli a kol., 2007).

V hostitelských buňkách se virové částice zástupců čeledi *Flexiviridae* objevují v podobě inkluzí, které se tvoří především v cytoplazmě a občas v jádře. Tyto inkluze mohou být vláknité nebo tuhé a nevláknité. Virová částice je tvořena jednou molekulou RNA o velikosti 6 – 9 kb, která je obalena kapsidovou podjednotkou (Martelli a kol., 2007). Genom této čeledi tvoří několik čtecích rámců (ORF) a jejich počet se liší u jednotlivých rodů (Adams a kol., 2004).

3.1.2 Charakteristika rodu *Capillovirus*

Rod *Capillovirus* (z latiny capillus = vlas) je jedním z rodů patřících do čeledi *Flexiviridae*. Tento rod obsahuje 4 druhy, *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Cherry virus A* (CVA), *Lilac chlorotic leafspot virus* (LiCLV) a dočasně je zde zařazen i druh *Nandina stem pitting virus* (NSPV) (ICTVdB, 2006).

Viriony rodu *Capillovirus* jsou vláknité a neobalené. Tvoří kapsidy, které jsou protáhlé a mají helikální symetrii (ICTVdB, 2006). Uvnitř virionu je jedna molekula RNA, tvořící 5 % hmotnosti virionu. Velikost virionu je 640 – 700 x 12 nm (Martelli a kol., 2007).



Obr. 1: Viriony rodu *Capillovirus*, fotografie z elektronového mikroskopu (převzato z <http://www.dpvweb.net/notes/showem.php?genus=Capillovirus>), měřítko 100 nm

Genom tvoří lineární (+)ssRNA a na 3'-konci má poly(A) úsek. Kompletní genom capillovirů má velikost 6,5 – 7,5 kb (ICTVdB, 2006). Zástupci rodu *Capillovirus* obsahují dva překrývající se otevřené čtecí rámce (ORFs). ORF1 kóduje velký polyprotein obsahující RdRp polymerázu a plášťový protein (CP). ORF2 kóduje

'movement' protein (MP). Někteří zástupci mohou mít čtecí rámeček zasahující do 3'-konce genu pláštěvého proteinu (ORF3) (Adams a kol., 2004).

Zástupci rodu *Capillovirus* se přenáší mechanicky očkováním, roubováním nebo se přenáší semeny. Přirozenými hostiteli jsou krytosemenné rostliny, především dvouděložné. Zástupci rodu *Capillovirus* jsou pravděpodobně distribuováni po celém světě, výskyt byl zaznamenán v Africe, jihovýchodní Asii, Euroasii, Severní Americe a Austrálii (ICTVdB, 2006).

3.2 Geografické rozšíření CVA

Cherry virus A (CVA) byl poprvé identifikován v Německu dr. Jelkmannem v roce 1995, ale má se za to, že je v současnosti rozšířen v Evropě, Asii a Severní Americe. Široká distribuce tohoto viru by mohla být důsledkem globálního pohybu genových zdrojů peckovin jako materiálu vyměňovaného za účelem šlechtění a zlepšení odolnosti kultivarů proti onemocněním (Rao a kol., 2009). Výskyt CVA byl oficiálně zaznamenán v třešňových výsadbách v Německu (Jelkmann, 1995; James a Jelkmann, 1998), v Kanadě (James a Jelkmann, 1998), v Britské Kolumbii (Eastwell a Bernardy, 1998), ve Velké Británii (Kirby a kol., 2001), v Polsku (Komorowska a Cieślińska, 2004), v Japonsku (Masamichi a kol., 2004), v Kalifornii (Sabanadzovic a kol., 2005), v Srbsku (Mandic a kol., 2007), v Číně (Rao a kol., 2009) a Indii (Noorani a kol., 2010). V roce 2008 byly zachyceny dva infikované vzorky i v České republice (Grimová a kol., 2010). Kromě třešně byl výskyt CVA zaznamenán i na švestkách ve Francii (Svanella-Dumas a kol., 2005) a v Itálii (Barone a kol., 2008) a dále také na broskvoních a japonských meruňkách v Číně (Marais a kol., 2008).

3.3 Biologické vlastnosti *Cherry virus A* (CVA)

3.3.1 Hostitelký okruh CVA

Cherry virus A infikuje různé druhy peckovin. Poprvé byl identifikován na višni (*Prunus cerasus* L.), která je společně s třešňí (*Prunus avium* L.) jeho přirozeným hostitelem (Barone a kol., 2006). Přítomnost CVA byla také vzácně zjištěna u dalších peckovin. Infekce virem CVA byla prokázána i u jiných hostitelů, ve Francii u

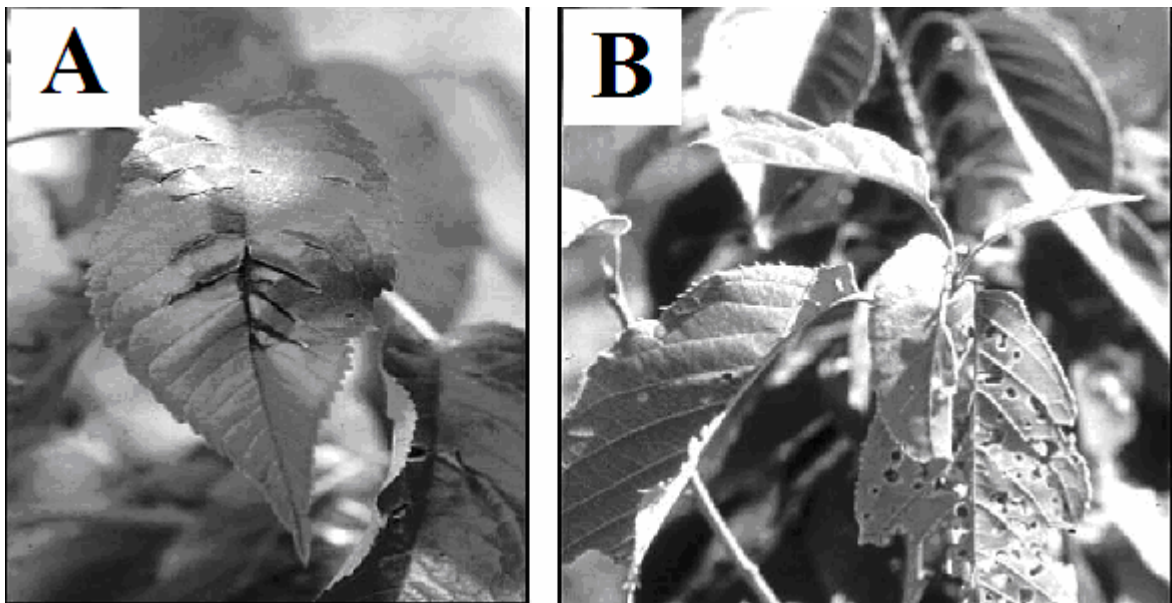
kultivarů mirabelek (*Prunus insititia* L.) a švestek (*Prunus domestica* L.) (Svanella-Dumas a kol., 2005) a později u kultivarů švestek v Itálii (Barone a kol., 2008). Jako další hostitelé byly následně prokázány broskvoně (*Prunus persica* L.) a japonské meruňky (*Prunus mume* L.) (Marais a kol., 2008).

3.3.2 Příznaky infekce

Cherry virus A byl původně spojován s výskytem ‘little cherry disease‘ (Jelkmann, 1995; Eastwell a Bernardy, 1998; Marais a kol., 2008). CVA není v dané chvíli spojován s výskytem konkrétní jedinečné choroby třešní a nezdá se, že by infekce samotným CVA vyvolávala zjevné příznaky na listech či plodech. I když někteří autoři uvádějí, že infekce virem *Cherry virus A* (CVA) může u vnímavých kultivarů a podnoží vyvolávat symptomy samostatně (James a Jelkmann, 1998), jejich infekce je obvykle latentní. Obecně se intenzita symptomů infekce výrazně zvyšuje při směsné infekci v kombinaci s jinými viry. Typickými příznaky vzniklými v důsledku koinfekce s jinými viry jsou nekróza žilek listů, nekrotické léze nebo chlorotické kroužky na listech. Nekrotické příznaky v CVA infikovaných rostlinách (tj. nekróza žilek a nekrotické léze na listech) jsou výsledkem infekce s *Prune dwarf virus* (PDV). Chlorotické kroužky na listech jsou výsledkem koinfekce CVA s *Plum bark necrosis stem pitting associated virus* (PBNSPaV) (Sabanadzovic a kol., 2005). V Itálii byla infekce CVA zjištěna na meruňkách, švestkách a třešních, často ve směsné infekci s *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apricot pseudo chlorotic leaf spot virus* (APCLSV) a nebo *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV) (Barone a kol., 2008).



Obr. 2: Listy zdravé třešně (*Prunus avium* L.)
(převzato z <http://danekchovanec.blog.cz/0805/tresen-obecna>)



Obr. 3: Příznaky směsné infekce na listech třešně (*Prunus avium* L.): A) nekróza listových žilek, B) nekrotické léze na listu (převzato z Sabanadzovic a kol., 2005)

3.3.3 Ovlivnění výnosu po infekci

Přestože infekce samotným *Cherry virus A* nezpůsobuje zjevné symptomy, ve směsné infekci s jinými druhy může způsobit vážné problémy v komerčních sadech peckovin, protože může ovlivňovat výnos a kvalitu produkce ovoce u jednotlivých stromů (Sabanadzovic a kol., 2005).

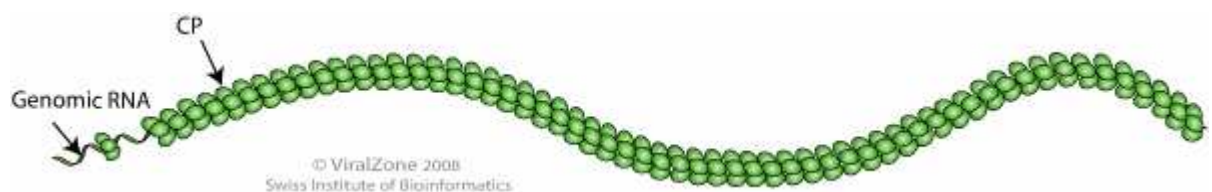
3.3.4 Způsob přenosu

Cherry virus A stejně jako ostatní zástupci rodu *Capillovirus* nejsou přenosné vektory. Přenášejí se pouze mechanicky a to roubováním (Noorani a kol., 2010, Rao a kol. 2009). Pokud je při roubování použit kontaminovaný materiál, dochází k snadné infekci rostlin virem (Noorani a kol., 2010, Rao a kol. 2009). Na rozdíl od jiných zástupců není CVA pravděpodobně přenosný semeny (ICTVdb, 2006). Množení materiálů pomocí roubování proto představuje nejvyšší riziko kontaminace množitelských materiálů a produkce stromků (Rao a kol., 2009; Sabanadzovic a kol., 2005).

3.4 Molekulární vlastnosti CVA

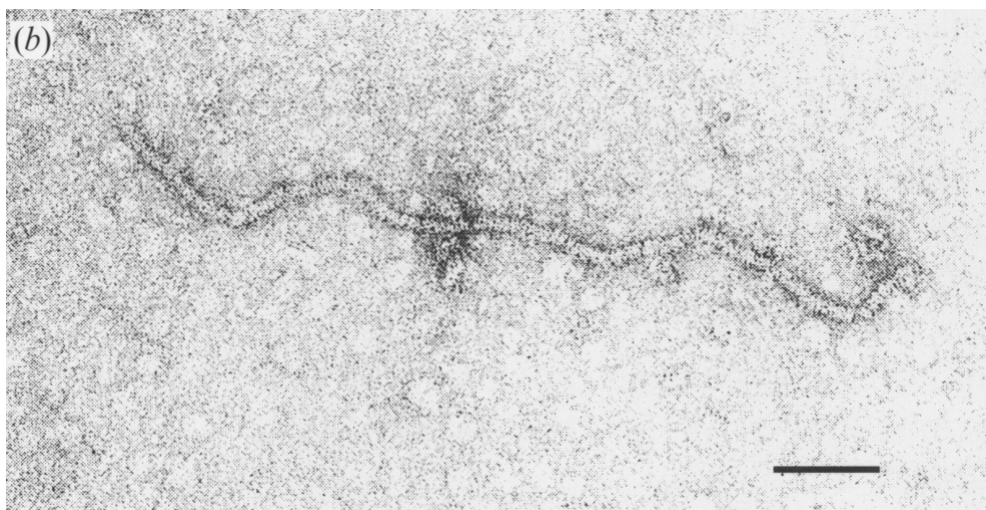
3.4.1 Morfologie virionu

Viriony *Cherry virus A* (viz. Obr. 4) tvoří kapsidy, které uvnitř uzavírají molekulou jednovláknové RNA. Kapsidy jsou neobalené, vláknité a protáhlé s helikální symetrií (viz. Obr. 5). Jsou tvořené plášťovým proteinem (CP). Velikost virionu je stejně jako u ostatních zástupců rodu *Capillovirus* 640-700 x 12 nm (ICTVdB, 2006).



Obr. 4: Schéma virionu

(převzato z http://expasy.org/viralzone/all_by_species/267.html)



Obr. 5: Vlákenný virion *Cherry virus A*, fotografie z elektronového mikroskopu (převzato z Jelkmann, 1995), měřítko 100 nm

3.4.2 Nukleová kyselina

Uvnitř kapsidu *Cherry virus A* je lineární, pozitivně orientovaná jednovláknová RNA. Poměrné zastoupení jednotlivých dusíkatých bází v molekule RNA je 20,7 % guaninu, 30,8 % adeninu, 20,7 % cytosinu a 29,8 % uracilu a 18,7 % cytosinu. Obsah guaninu + cytosinu v genomu je 39,4 % (ICTVdB, 2006).

3.4.3 Proteiny

Virový genom kóduje strukturální a nestrukturální proteiny. Kapsidový protein má molekulární hmotnost 24000 Da (ICTVdB, 2006).

3.4.4 Lipidy

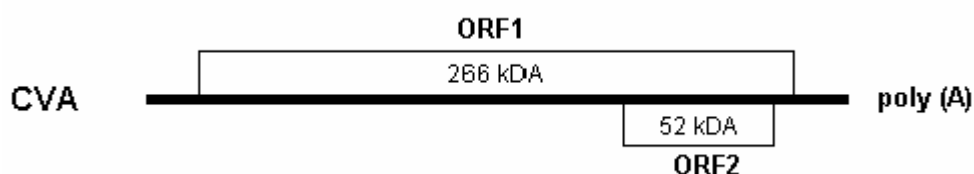
Viriony *Cherry virus A* neobsahují žádné lipidy (ICTVdB, 2006).

3.4.5 Charakteristika genomu

Genom *Cherry virus A* (CVA) svou strukturou odpovídá typickému zástupci rodu Capillovirus. Je tvořen lineární (+)ssRNA, která má na 3'- konci má poly(A) úsek (ICTVdB, 2006). Kompletní genom je tvořený sekvencí 7383 nukleotidů. Organizace genomu CVA je podobná *Apple stem grooving virus* (ASGV) (Jelkmann, 1995).

CVA obsahuje dva překrývající se čtecí rámce (ORFs) (viz. Obr. 6). První čtecí rámec ORF1 (pozice 55 – 7081 nt) kóduje polyprotein s molekulovou hmotností $M_r = 266410$ Da (266 kDa) (viz. Obr. 7) (Jelkmann, 1995; James a Jelkmann, 1998; Noorani a kol., 2010). ORF1 kóduje všechny proteiny související s replikací viru a vykazují vysokou podobnost se ‘Sindibis-like’ viry (Jelkmann, 1995). V ORF1 bylo identifikováno celkem pět proteinových oblastí: virová methyltransferáza, doména neznámé funkce DUF1717, helikáza, RNA – dependentní RNA polymeráza a plášťový protein (CP) (viz. Obr. 7) (Jelkmann, 1995; Noorani, 2010). Typické methyltransferázové motivy I – IV methyltransferázy jsou umístěny v N – terminální oblasti ORF1 (pozice 241 – 798 nt). Šest helikázových motivů je umístěno ve střední části ORF1 (pozice 2506 – 3321 nt). Konzervativní bloky RNA dependentní RNA polymerázy leží v oblasti nt 4081 – 4776. Sekvence plášťového proteinu (CP) se nachází v C – terminální oblasti ORF1. Protože počátek CP genu nebyl přesně identifikován, byl plášťový protein detekován pomocí imunoblotingu a jeho velikost se odhaduje na 24 kDa. Předpokládaná aminokyselinová sekvence v C - terminální oblasti ORF1 vykazuje vysokou identitu s plášťovými proteiny rodů *Capillovirus* a *Trichovirus* (Jelkmann, 1995).

Druhý čtecí rámec ORF2 (pozice 5400 – 6790 nt) je umístěný v ORF1 a poly (A) konci kóduje polyprotein o s molekulovou hmotností $M_r = 52175$ Da (52 kDa) (viz. Obr. 6) (Jelkmann, 1995; James a Jelkmann, 1998; Noorani a kol., 2010). ORF2 kóduje ‘movement’ proteiny (MP), které vykazují identitu především s MP *Apple stem grooving virus* (ASGV) (28 %) a *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) (23 - 24 %) (Jelkmann, 1995; Noorani a kol., 2010). Nicméně je v organizaci genomu CVA a zástupců rodu *Trichovirus* podstatný rozdíl, genom trichovirů se na rozdíl od CVA skládá ze tří mírně se překrývajících čtecích rámců (Jelkmann, 1995).



Obr. 6: Schématické znázornění umístění čtecích rámců v genomu *Cherry virus A* (CVA) (převzato z Jelkmann, 1995).



Obr. 7: Schéma organizace genomu *Cherry virus A*
(podle http://expasy.org/viralzone/all_by_species/267.html)

3.5 Variabilita genomu

Většina dalších autorů se soustředí na zjištění identity získaných izolátů s referenčním, původním izolátem získaným dr. Jelkmannem, jehož úplná genomická sekvence je dostupná v databázi GenBank, Ac. No. NC_003689. Tři CVA cDNA klony z Britské Kolumbie, Kanada (p9, p92 a p11), které pocházely ze vzorku odebraného z jednoho stromu, vykazovaly identitu na úrovni nukleotidů 92 %, 87 % a 89 % s genomem CVA. Sekvence aminokyselin klonu p9 byla ze 76 % identická s ORF1 a z 81 % identická s ORF2 genomu CVA (Eastwell a Bernardy, 1998). Sekvence plášťového proteinu (397bp) polského izolátu CVA 89% homologii s odpovídající oblastí referenčního izolátu NC_003689 (Komorowska a kol., 2004). Testování CVA na vzorcích mirabalánu francouzského původu, vedlo k detekci jediného izolátu CVA vykazujícího 88,1 % nukleotidovou a 93,2 % aminokyselinovou identitu s NC_003689 (Svanella-Dumas a Marais, 2005). Izoláty získané v Kalifornii vykazovaly vyšší, a to 91 až 93 % homologii s tímto izolátem viru CVA (Sabanadzovic a kol., 2005). V Kampánii v Itálii porovnání detekovaných CVA sekvencí jak mezi sebou, tak s databází sekvencí prokázalo stupeň nukleotidové identity 80,3 až 99,6 % (86,8 až 100 % u aminokyselinových sekvencí) (Barone a kol., 2006). Dva izoláty z Číny, ve kterých byl detekován CVA, vykazovaly vysokou homologii (97,5 až 99,3 %) s jinými izoláty CVA z databáze GenBank (AY7925, DQ445275, DQ445292) nepocházejícími z třešně. Třetí čínský CVA izolát vykazoval nejvyšší homologii s izolátem CVA z databáze GenBank (AF413923) pocházejícího z třešně (Marais a kol., 2008). Při porovnání CVA sekvencí z Číny se sekvencemi z databáze GenBank byla prokázána 98 % nukleotidová identita a 99 % aminokyselinová identita s izolátem CVA z Německa (NC_003689) (Rao a kol., 2009). V Indii porovnávaná sekvence CVA ukázala 81 až 84 % podobnost s typem izolátu CVA z Německa na nukleotidové a aminokyselinové úrovni (Noorani a kol., 2010).

Studiem vlastní genetické variability genomu *Cherry virus A* (CVA) se zabývala Marais a kol. (2008). Celkem bylo analyzováno 79 izolátů - 49 původem z příznakových i nepříznakových třešní, 3 pocházejících z původních italských kultivarů, 17 izolátů získaných z jiných hostitelů než z třešně (švestky nebo meruňky), včetně 10 CVA sekvencí získaných z mezinárodních databází. Analýza genetické variability izolátů byla zaměřena na studium krátkých fragmentů virové RNA dependentní RNA polymerázy vytvořených PDO nested RT-PCR. Fylogenetická analýza těchto sekvencí odhalila značný stupeň variability nukleotidových sekvencí mezi jednotlivými izoláty, průměrná diverzita dosahovala 9,4 %. Na základě této variability bylo identifikováno pět fylogenetických skupin s podstatnou odlišností v genomu. Průměrná genetická vzdálenost mezi jednotlivými skupinami v sekvencované oblasti dosáhla 19 %. Existence těchto pěti skupin jednoznačně podporuje míru pozorované nukleotidové variability. Zjištěné fylogenetické vztahy podpořili i dílčí analýzou CVA1-CVA2 fragmentů (Marais a kol., 2008).

3.6 Detekce a identifikace

Pro detekci a identifikaci se používají sérologické nebo molekulární metody nebo elektronová mikroskopie.

3.6.1 Sérologické metody

Mezi sérologické metody patří DAS-ELISA, jejíž podstatou je interakce mezi antigenem a protilátkou. V současné době se většinou provádí komerčně kupovanými kity a provádí se podle návodů výrobce. DAS-ELISA kit nebo protilátky proti CVA pro detekci *Cherry virus A* nejsou komerčně dostupné, ale pro ostatní zástupce rodu *Capillovirus* je tato metoda používána.

3.6.2 Molekulární metody

Molekulární metoda využívána pro detekci a identifikaci zástupců rodu *Capillovirus*, a tedy i pro *Cherry virus A* (CVA), je tzv. dvoukroková RT-PCR. Vzhledem k tomu, že rod *Capillovirus* jsou ssRNA viry, jejich RNA přepsána procesem reverzní transkripce (RT), při níž dochází k hybridizaci primeru a je syntetizována

komplementární cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptáza. Poté dochází k amplifikaci vybraného úseku cDNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato reakce probíhá za účasti primerů, které ohraničují amplifikovaný fragment a specifický enzym, Taq DNA polymeráza, namnoží konkrétní úsek DNA. PCR reakce je založena na opakujících se cyklech, které se skládají z denaturace DNA, hybridizace primerů a syntézy komplementárního vlákna.

Poprvé byla RT-PCR použita pro detekci CVA v roce 1995 Jelkmannem, který navrhl specifické primery (viz. Tab. 1). Předpokládaná velikost amplifikovaného fragmentu byla 834 bp (Jelkmann, 1995). Primery CVA1 / CVA2 použili také James a Jelkmann pro analýzu vzorků pomocí RT-PCR. Reverzní transkripce (RT) probíhala za těchto podmínek: 5 µl RNA a 2 µl CVA1 primeru (5 pmol) bylo inkubováno při 75°C po dobu 5 min, poté bylo přidáno 13 µl reakčního premixu (4 µl pufru (GIBCO BRL), 2 µl 0,1 M DDT (dithiothreitol), 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,25 µl inhibitoru ribonukleázy (GIBCO BRL.), 0,5 µl RT polymeráza Superscript II (GIBCO BRL), zbytek objemu doplněn dEPC deionizovanou vodou), celkový objem 20 µl byl inkubován při 42°C po dobu 45 min. Po ukončení RT bylo přidáno 80 µl PCR reakčního premixu ve složení 1,5 µl 10 mM dNTP, 3 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl CVA1 primer (5 pmol), 2 µl CVA2 primer (5 pmol), 1 µl Taq DNA polymerázy (GIBCO BRL), 1 µl Taq Extender PCR Additive, 10 µl 10x Taq Extender pufr a zbytek objemu doplněn dEPC deionizovanou vodou. Polymerázová řetězová reakce (PCR) proběhla v 35 cyklech, každý cyklus probíhal při 94°C po dobu 30 sec, při 55°C po dobu 45 sec, při 72°C po dobu 1 min a závěrečné prodloužení při 72°C po dobu 10 min (James a Jelkamann, 1998). Také Marais a kol. použili primery CVA1 a CVA2 a to k analýze genové diversity *Cherry virus A*. Reverzní transkripce v tomto případě probíhala při 42°C po dobu 45 min a enzymy byly denaturovány při 95°C po dobu 5 min. PCR reakce spočívala ve 40 cyklech, každý cyklus probíhal při 95°C po dobu 1 min, při 55°C po dobu 1 min, při 72°C po dobu 1 min. Výsledný PCR produkt měl při použití primerů CVA1 a CVA2 velikost 834 bp (Marais a kol., 2008).

Noorani a kol. (2010) navrhli pro detekci CVA kombinaci jiných primerů, CVAU5839 a CVAL6905 (viz Tab. 1). Reverzní transkripce probíhala za stejných podmínek jako u předešlých při 42°C po dobu 45 min, pak následovala inkubace při 80°C po dobu 5 min. PCR reakce zahrnovala 40 cyklů, každý cyklus probíhal při 94°C po dobu 30 sec, při 52°C po dobu 30 sec, při 68°C po dobu 7 min a závěrečné prodloužení při 68°C po dobu 10 min. Velikost PCR produktu byla 1089 bp.

Také Grimová a kol. (2010) prováděli detekci CVA za pomoci vlastního nově navrženého páru primerů, CVAF2 a CVAR2 (viz. Tab. 1). PCR reakce zahrnovala celkem 35 cyklů, přičemž každý cyklus proběhl při 94°C po dobu 30 sec, při 52°C po dobu 30 sec, při 72°C po dobu 1 min a závěrečné prodloužení při 72°C po dobu 7 min. velikost PCR produktu byla 405 bp.

Ve snaze vyvinout co nejspolehlivější metodu detekce *Cherry virus A* byla navržena metoda PDO nested RT-PCR ('Polyvalent Degenerated Oligonucleotide nested RT-PCR'). Tato metoda byla vyvinuta pro detekci vláknitých virů ovocných stromů, které patří k rodům *Trichovirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus* a je variantou nested RT-PCR. Pro amplifikaci cílových virů byly navrženy degenerované primery obsahující inosin a s jejich pomocí se podařilo amplifikovat část oblasti virového genomu kódující RdRp polymerázů flexivirů, náležícím ke všem třem rodům *Trichovirus*, *Capillovirus*, *Foveavirus*. Jejich specifitu je ale nutno ověřit sekvencováním (Foissac a kol., 2001).

Pro detekci *Cherry virus A* byla úspěšně použita i dot-blot hybridizace. Tato metoda spočívá v přípravě digoxigeninem značené cDNA, která je pak použita jako sonda k detekci viru. Např. James a Jelkmann (1998) uvádí postup dot-blot hybridizace, při kterém byly vzorky RNA denaturovány formaldehydem a inkubovány při 60°C po dobu 30 min a poté ihned umístěny na led. RNA byla následně přenesena na membránu a stabilizována na membráně UV zářením. Prehybridizace a hybridizace byly prováděny v 50% roztoku formamidu při 42°C. Membrány pak byly dvakrát promyty v 2 x SSC pufru (standardní citrátový pufr) s 0,1% SDS (dodecyl sulfát sodný) a poté ještě dvakrát promyty v 0,1 x SSC pufru s 0,1% SDS a 1 mM ethylendiamintetraoctové kyselině. Kolorimetrická detekce byla provedena, jak je popsáno dodavatelem DIG DNA Labeling kit. Obdobný postup dot-blot hybridizace uvádí i Marais a kol. (2001), pouze s tím rozdílem, že hybridizace probíhala při 65°C po dobu 16 hod a chemiluminiscenční detekce byla provedena za použití anti-digoxigeninového alkalického fosfatázového konjugátu a substrátu (Marais a kol., 2001).

Při porovnávání účinnosti různých metod detekce CVA - RT-PCR amplifikace s pomocí primerů CVA1 / CVA2 podle James a Jelkmann (1998), PDO nested RT-PCR podle Foissac a kol. (2001) (viz. Tab. 1) a dot-blot hybridizaci, bylo zjištěno, že PDO nested PCR umožnila nejspolehlivější detekci infekce virem CVA. Na rozdíl od toho RT-PCR ani dot-blot hybridizace neumožnily úspěšnou detekci CVA ve všech analyzovaných vzorcích, celkově bylo pouze 69 % těchto pozitivních vzorků detekováno jednou nebo druhou z těchto metod (Marais a kol., 2008).

Tab. 1: Sekvence primerů použité pro RT-PCR

Označení	Sekvence primerů	Autoři
CVA1	5' TTGATTTCGTCTCCTGCGACT 3'	Jelkmann, 1995
CVA2	5' GAATACTCAAGCTTACTGAAG 3'	
reverse primer	5' TCAGCTGCCTCAGCTTGGC 3'	Rao a kol., 2009
forward primer	5' GTGGCATTCAACTAGCACCTAT 3'	
CVAU5839	5' CAATGTCCACACATGATCCA 3'	Noorani a kol., 2010
CVAL6905	5' GACAGCTGGGCAATGAAGTAGG 3'	
CVAZR2	5' ACCTTTGGAACAAACGATGC 3'	Grimová a kol., 2010
CVAZF2	5' CAAGAATCCAGGGGCCTACT 3'	
PDO-Fli	5' TiTTYATKAARWSiCARYWiTGiAG 3'	Foissac a kol., 2001
PDO-R3i	5' GCRCACATRTCRTCiCCiGCRAAiiA 3'	
PDO-R4i	5' ARiYiCCATCCRCARAAMiTiGG 3'	

3.6.3 Elektronová mikroskopie

Pomocí elektronové mikroskopie lze v ultratenkých řezech listů a semen detekovat přítomnost inkluzních tělísek a virionů (Roberts a kol., 2003). Tato technika je vzhledem ke své náročnosti málo využívaná.

3.6.4 Frekvence CVA infekce

Obecně se má za to, že CVA je rozšířen celosvětově, frekvence jeho výskytu se ale v různých zemích liší, zaznamenaný výskyt *Cherry virus A* se pohybuje v rozsahu 1 % - 94 %.

Nižší frekvence výskytu CVA infekce byla zjištěna na území Německa, Kanady, Itálie, Indie a České republiky. Poprvé byl *Cherry virus A* (CVA) detekován v Německu

ve 28 vzorcích (31 %) z celkových 88 analyzovaných vzorků (Jelkmann, 1995). Ve vzorcích z Německa a Kanady byl detekován dot blot hybridizací a RT-PCR pomocí specifických primerů v téměř 40 % vyšetřovaných vzorků (James a Jelkmann, 1998). Vzorky odebrané v Kampánii v Itálii byly analyzovány polyvalentní RT-PCR. Přítomnost CVA byla detekována v 6 ze 14 vzorků meruňek (*Prunus armeniaca* L.), v 1 ze 6 vzorků švestek (*Prunus domestica* L.) a 1 ze 4 vzorků třešní (*Prunus avium* L.). Celkem byl CVA detekován v 8 (33 %) ze 24 vzorků (Barone a kol., 2008). V Indii bylo na CVA pozitivních 25 vzorků (28 %) z celkových 89 vzorků ze států Jammu a Kašmír a dále 3 vzorky (13 %) z celkových 24 vzorků ze státu Himachal Pradesh (Noorani a kol., 2010). V České republice bylo na přítomnost CVA testováno celkem 200 vzorků třešní, z nichž pouze 2 (1 %) byly pozitivní na CVA (Grimová a kol., 2010).

Oproti těmto zemím je vysoká frekvence výskytu CVA infekce ve Velké Británii, v Japonsku, v Srbsku a v Číně. Ve Velké Británii byl CVA detekován v 15 (94 %) ze 16 vzorků třešní (Kirby a kol., 2001). V Japonsku byl CVA detekován ve 45 ze 49 stromů, 35 z nich vykazovalo symptomy 'bud blight disease' a 10 z nich nevykazovalo příznaky infekce. Vzhledem k tomu, že byl *Cherry virus A* detekován v 92 % testovaných stromů, je pravděpodobně přítomen ve většině stromů třešní v Japonsku, ale nezpůsobuje žádné příznaky (Masamichi a kol., 2004). V Srbsku byl CVA testován celkem ve 13 vzorcích (8 vzorků višně, 5 vzorků třešně), nichž byl detekován v 11 vzorcích (84 %) (7 vzorků višně, 4 vzorky třešně). Často byl nalezen ve směsné virové infekci (Mandic a kol., 2007). Ze 4 vzorků japonské meruňky (*Prunus mume* L.) z Číny byl CVA detekován ve 3 vzorcích, tedy v 75 % vzorků (Marais a kol., 2008).

4. Experimentální část

Cílem experimentální části bylo dekovat přítomnost *Cherry virus A* (CVA) ve souboru vzorků třešní a višní.

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako biologický materiál k detekci přítomnosti dvou významných virů infikujících *Cherry virus A* a *Little cherry virus 1* bylo použito 26 vzorků RNA získaných z třešní a višní českého původu. Vybrané stromy nevykazovaly žádné příznaky virové infekce (Šafářová, osobní sdělení).

4.1.2 Reverzní transkripce

Virová cDNA získána pomocí reverzní transkripce (RT), za pomoci specifického ,reverze´ primeru.

4.1.2.1 Reakční směs pro RT

Reverzní transkripce byla provedena ve dvou po sobě následujících krocích.

Byly připraveny reakční směsi I (premix I) a reakční směs II (premix II). Složení premixu I bylo 9 μ l dEPC deionizované vody a 1 μ l (1 μ M) primeru. Směs o objemu 10 μ l byla nepipetována do 0,5 ml tenkostěnných PCR zkumavek. Pro CVA cDNA syntézu byl použit specifický CVA-rev1 primer (viz. Tab. 2); pro syntézu LChV-1 cDNA byl použit specifický primer LCV3EC (5'GGCACCTTTTATTTTTTATATATGC3') podle Rott a Jelkmann (2001).

Byl připraven premix II ve složení: 14,9 μ l dEPC neionizované vody, 8 μ l AMV-RT-PCR pufru (5x), 2,6 μ l dNTPs (10 mM, Fermentas), 0,5 μ l inhibitoru ribonukleasy (40 U/ μ l, Promega) a 1 μ l AMV reverzní transkriptázy (10 U/ μ l, Promega); celkový objem 27 μ l.

4.1.2.2 Podmínky a provedení reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena v konečném objemu 40 μ l.

K premixu I byly přidány 3 μ l izolované RNA a reakční směs byla následně inkubována po dobu 5 min. při 70°C. Vzorky byly okamžitě po ukončení inkubace přeneseny na led.

K reakční směsi bylo přidáno 27 μ l premixu II a byla provedena reverzní transkripce po dobu 60 min při 42°C v termocyleru Thermal Cycler Gene E (Techne).

Vzorky byly po ukončení syntézy cDNA dlouhodobě uchovávány při -20°C.

4.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Specifické virové ampliony byly získány pomocí následné PCR reakce, fragmenty byly amplifikovány pomocí specifických primerů.

4.1.3.1 Reakční směs pro PCR amplifikace

Pro PCR detekci virů byla připraveny reakční směs ve složení: 2,5 μ l Platinum Taq pufru (Introgen) (10x), 0,75 μ l MgCl₂ (50 mM), 12,9 μ l deionizované vody, 3,1 μ l dNTP (2 mM) (Fermentas), 1,25 μ l 'forward' (F) primeru (20 pmol/ μ l), 1,25 μ l 'reverze' (R) primeru (20 pmol/ μ l) a 0,2 μ l Platinum Taq polymerázy (Introgen) (5 U/ μ l). K reakční směsi byly přidány 3 μ l cDNA připravené v předchozí 'viru specifické' reverzní transkripci, celkový objem PCR reakce byl 25 μ l.

Pro detekci *Cherry virus A* (CVA) byla použita kombinace primerů (viz. Tab. 2):

➤ CVA-fw1 / CVA-rev1

Pro detekci *Little cherry virus-1* (LChV-1) byla použita kombinace primerů (viz. Tab.2):

➤ LCV1U16390 / LCV1L16809

Tab. 2: Sekvence primerů použité při RT-PCR

Označení	Sekvence	Poznámka
CVA-fw1	5' CAACTGCCGCAGATGTTGG 3'	Marais a kol., 2011
CVA-rev1	5' AGMCCTACATGAATTTGACCT 3'	
LCV1U16390	5' TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA 3'	Rott a Jelkmann, 2001
LCV1L16809	5' GGTAAGCGGTATAAAAACCCTCCTCT 3'	

4.1.3.2 Podmínky PCR reakce

Podmínky PCR reakce pro detekci CVA:

- Počáteční predenaturace 95 °C, 3 min
- Amplifikace 35 cyklů:
 - Denaturace 95 °C, 30 sec
 - Hybridizace primerů (annealing) 54 °C, 30 sec
 - Prodlužování primerů (extension) 72 °C, 1 min
- Závěrečná elongace 72 °C, 10 min

Podmínky PCR reakce pro detekci LChV1:

- Počáteční predenaturace 95 °C, 3 min
- Amplifikace 35 cyklů:
 - Denaturace 95 °C, 1 min
 - Hybridizace primerů (annealing) 55 °C, 1 min
 - Prodlužování primerů (extension) 72 °C, 1 min
- Závěrečná elongace 72 °C, 5 min

4.1.3.3 Vyhodnocení PCR amplifikace, detekce PCR produktů

Výsledek PCR reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforetické separace PCR produktů (ELFO) v 1,5 % agarózovém gelu (Amresco) v prostředí TAE pufru (viz. příloha). DNA byla barvena přímo přidáním barviva GelRed nucleic acid stain (Biotium, Ltd.) do gelu před elektroforetickou separací. Při přípravě gelu byly do 50 ml agarózy přidány 3 µl barviva. Vzorčky byly nanášeny na ELFO postupně, do první jamky gelu byl vždy nanesen GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas) o objemu 2 µl. Na gel bylo nanášeno 5 µl PCR produktu smíchaného se 2 µl 6x Loading dye (Promega). Migrace vzorků probíhala při stejnosměrném napětí 80 V po dobu 45 min v prostředí TAE. Vizualizace a dokumentace PCR produktů byla provedena pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene (Synoptics Ltd., UK).

4.2 Výsledky a diskuse

Ve vybraném souboru vzorků třešní a višní získaných na území České republiky byla provedena detekce významných *Cherry virus A* (CVA) a *Little cherry virus-1* (LChV-1). K detekci CVA i LChV-1 byla zvolena metoda RT-PCR.

4.2.1 *Cherry virus A* (CVA)

Pro detekci přítomnosti *Cherry virus A* (CVA) byla použita metoda RT-PCR podle Marais a kol. (2011).

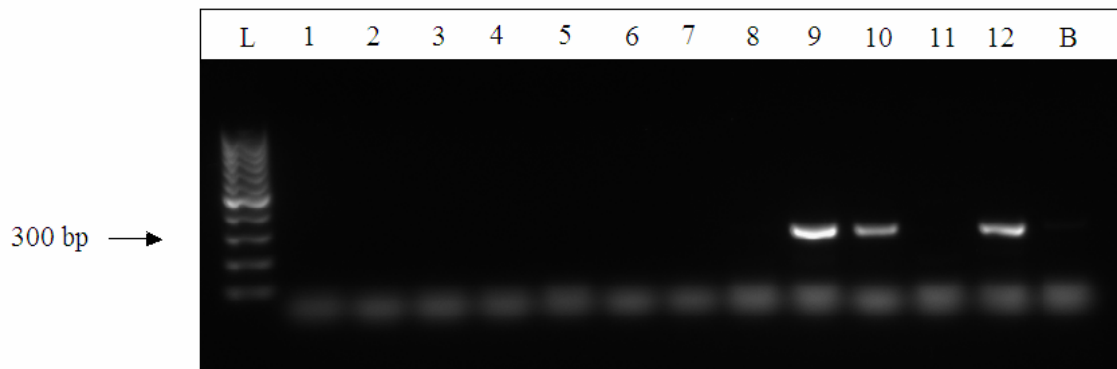
Pro RT byl použit ‚reverse‘ primer CVA-rev1 a pro PCR byla použita kombinace primerů CVA-fw1 / CVA-rev1. Očekávaná velikost amplifikovaného fragmentu, dokazujícího přítomnost CVA byla 302 bp.

Cherry virus A byl detekován v osmi vzorcích z celkových 26 analyzovaných vzorků (viz. Obr.7; Obr.8). Ve všech těchto vzorcích byl detekován PCR produkt o předpokládané velikosti cca 300 bp. Z toho vyplývá, že výskyt CVA byl prokázán v 30,77 % případů. U vzorku č. 16 byl nalezen slabý produkt (viz. Obr. 8), a proto nebyl hodnocen jako pozitivní nález.

Zjištěná přítomnost CVA potvrzuje dříve výskyt CVA v České republice (Grimová a kol., 2010). V porovnání s jejich výsledky Grimové a kol., kteří našli pouze 2 pozitivní vzorky z celkem 200 tetsovaných vzorků, naše výsledky naznačují četnější

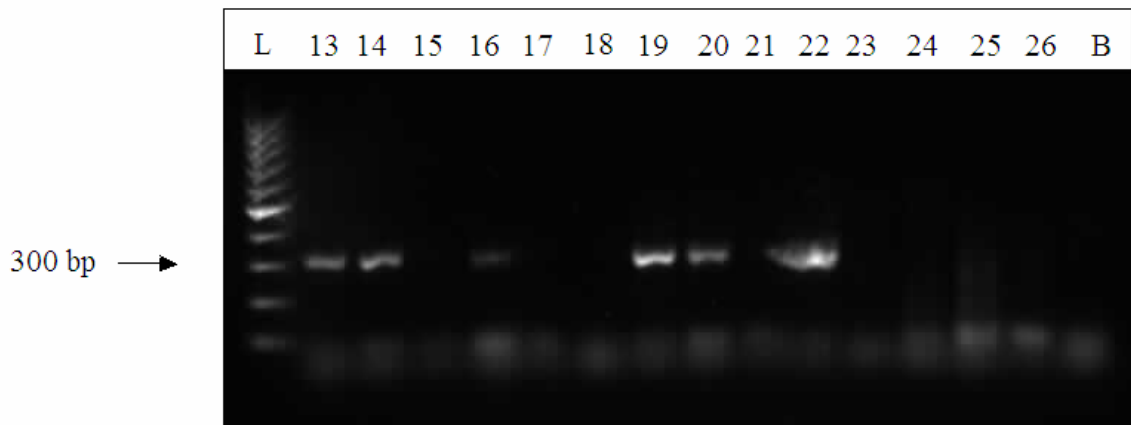
výskyt CVA v České republice. Vyšší četnost výskytu CVA může být způsobena výběrem analyzovaných vzorků. Zjištěné rozdíly ale mohou souviset se spolehlivostí detekce viru pomocí zvolených PCR primerů. Grimová a kol. (2010). Použili pro detekci CVA vlastní kombinaci primerů CVAZR2 / CVAZF2, které nemusí postihnout variabilitu amplifikované oblasti genomu viru. Tuto spekulaci by potvrzovala i zjištění Marais a kol. (2008), kteří zaznamenali odlišnou spolehlivost detekce *Cherry virus A* při použití různých specifických nebo předpokládaných univerzálních metod.

Zjištěný více než třiceti procentní výskyt CVA je však oproti jiným evropským zemím jako např. Velká Británie, Francie, Německo nízký. Pro jeho ověření by bylo nezbytné analyzovat větší soubor vzorků pocházejících z různých lokalit České republiky.



Obr. 7: Detekce CVA ve vzorcích 1 – 12

(L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; dráhy 1 – 12: vzorky č. 1 – 12, B: voda (negativní kontrola); šipka označuje specifický produkt)



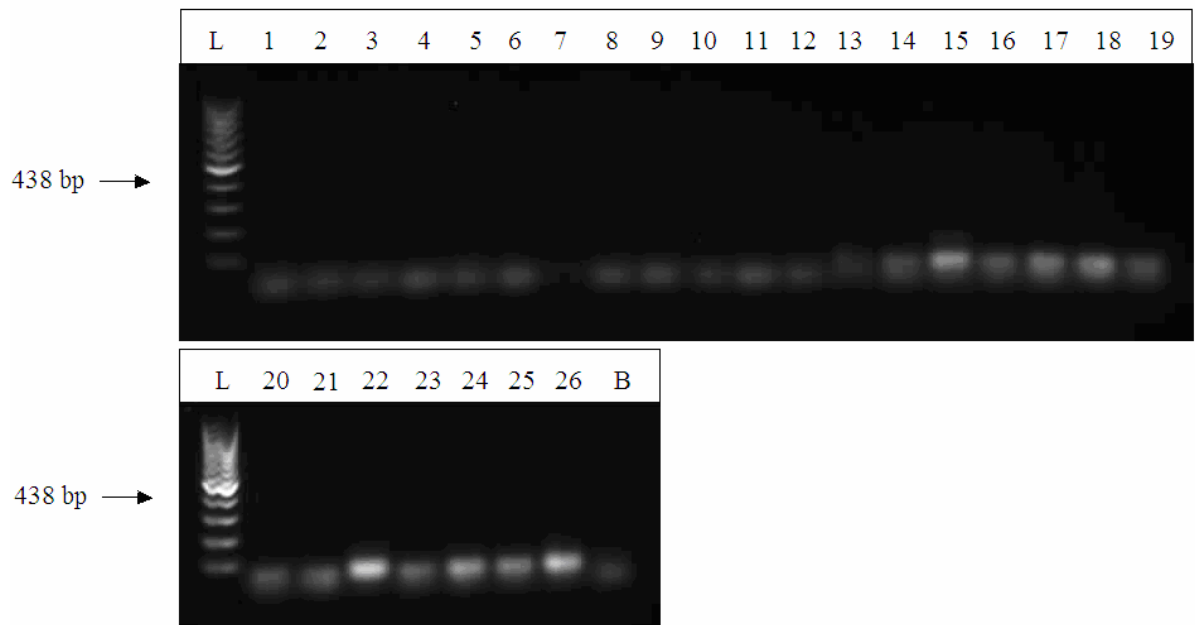
Obr. 8 : Detekce CVA ve vzorcích 13 – 26

(L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; dráhy 13 – 26: vzorky č. 13 - 26, B: voda (negativní kontrola); šipka označuje specifický produkt).

4.2.2 *Little cherry virus-1* (LChV-1)

Soubor testovaných českých vzorků byl analyzován i na přítomnosti pro třešně významného patogena *Little cherry virus-1* (LChV-1). Pro detekci LChV-1 byla použita metoda RT-PCR za pomoci primerů LCV3EC (syntéza cDNA) a LCV1U16390 / LCV1L16809 (PCR amplifikace) podle Rotta Jelkmann (2001). Očekávaná velikost amplifikovaného fragmentu, dokazujícího přítomnost LChV-1 byla 438 bp.

RT-PCR amplifikace byla ve všech 26 vzorcích negativní, výskyt významného patogenu – viru *Little cherry virus-1* nebyl v analyzovaném souboru vzorků prokázán.



Obr. 9: Detekce LChV-1 ve vzorcích 1 – 26

(L: 100 bp DNA ladder, Fermentas; dráhy 1 – 26: vzorky č. 1 – 26, B: voda (negativní kontrola); šipka označuje velikost očekávaného produktu)

5. Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o *Cherry virus A* (CVA), náležícího do rodu *Capillovirus*, čeledi *Flexiviridae*. CVA je rozšířen v Evropě, Asii a Severní Americe a jeho přirozeným hostitelem je třešeň (*Prunus avium* L.) a višněň (*Prunus cerasus* L.), méně často pak další zástupci rodu *Prunus*. Zatím nebylo prokázáno, že by infekce CVA vyvolávala zjevné příznaky a proto není spojován s žádnou konkrétní chorobou peckovin, ale ve směsné infekci může zvyšovat intenzitu příznaků vyvolaných dalšími viry. Virus je přenosný pouze mechanicky, roubováním. CVA je (+)ssRNA virus, jehož genom je tvořen dvěma překrývajícími otevřenými čtecími rámci (ORFs). První čtecí rámec ORF1 kóduje všechny proteiny související s replikací viru a plášťový protein (CP). Druhý čtecí rámec ORF2 umístěný v ORF1 a poly (A) konci kóduje 'movement' protein (MP). Pro detekci CVA se nejčastěji používají molekulární metody založené na RT-PCR nebo dot-blot hybridizaci.

Praktická část této práce se zabývá detekcí přítomnosti CVA a *Little cherry virus-1* (LChV-1). V souboru analyzovaných kultivarů třešní a višní byla prokázána přítomnost CVA v 30, 77 % vzorků, zatímco přítomnost LChV-1 ve vzorcích prokázána nebyla.

6. Seznam použité literatury

- Adams, M. J.; Antoniw, J. F.; Bar-Joseph, M.; Brunt, A. A.; Candresse, T.; Foster, G. D.; Martelli, G. P.; Milne, R. G.; Zavriev, S. K.; Fauquet, C. M. (2004): The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045-1060.
- Barone, M.; Alioto, D.; Ragozzino, A.; Candresse, T. (2008): Investigation on occurrence of *Tricho*-, *Fovea*- and *Capilloviruses* in ancient fruit tree cultivars in Campania. *Acta Horticulturae* 781: 53-58.
- Barone, M.; Alioto, D.; Marais, A.; Candresse, T.; Ragozzino, A. (2006): First report and high prevalence in noncherry host of *Cherry virus A* in Italy. *Plant Disease* 90: 1459.
- Eastwell, K. C.; Bernardy, M. G. (1998): Relationship of *Cherry virus A* to little cherry disease in British Columbia. *Acta Horticulturae* 472: 305-313.
- Foissac, X.; Svanella-Dumas, L.; Dulucq, M. J.; Candresse, T.; Gentit, P. (2001): Polyvalent detection of fruit tree *Tricho*-, *Capillo*- and *Foveaviruses* by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* 550: 37-43.
- Foissac, X.; Svanella-Dumas, L.; Gentit, P.; Dulucq, M.-J.; Marais, A.; Candresse, T. (2005): Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: A polyvalent detection and characterization tool for *Trichoviruses*, *Capilloviruses* and *Foveaviruses*.
- Grimová, L.; Zouhar, M.; Ryšánek, P.; Drabešová, J.; Mazáková, J.; Paprštejn, F. (2010): First occurrence of *Cherry virus A* (CVA) in the Czech Republic. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 275-277.
- Isogai, M.; Aoyagi, J.; Nakagawa, M.; Kubodera, Y.; Satoh, K.; Inamori, M.; Yamashita, K.; Yoshikawa, N. (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70: 288-291.
- ICTVdB Management (2006). 00.056.0.06.005.*Cherry virus A*. In: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb>)
- James, D.; Jelkmann, W. (1998): Detection of *Cherry virus A* in Canada and Germany. *Acta Horticulturae* 472: 299-304.

- Jelkmann W. (1995): Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant *Capillovirus* in sweet cherry. *Journal of General Virology* 75: 2015-2024.
- Kirby, M. J.; Kirby, M. J.; Adams, A. N. (2001): Occurrence of *Cherry virus A* in the UK. *Plant Pathology* 50: 801.
- Komorowska, B.; Cieślińska, M. (2004): First report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant Disease* 88: 909.
- Mandić, B.; Matic, S.; Al-Rwahneh, M.; Jelkmann, W.; Myrta, A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. *Journal of Plant Pathology* 89: 103-108.
- Marais, A.; Faure, C.; Svanella-Dumas, L.; Candresse, T. (2008): First report of *Cherry virus A* in *Prunus mume* in China. *Plant Disease* 92: 1589.
- Marais, A.; Svanella-Dumas, L.; Candresse, T.; Barone, M.; Ragozzino, A.; Gentit, P. (2008): Genomic diversity of *Cherry capillovirus A* (CVA) and suitability of various assays for its detection. *Acta Horticulturae* 781: 37-45.
- 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.
- Noorani, M. S.; Awasthi, P.; Singh, R. M.; Ram, R.; Sharma, M. P.; Singh, S. R.; Ahmed, N.; Hallan, V.; Zaidi, A. A. (2010): Complete nucleotide sequence of *Cherry virus A* (CVA) infecting sweet cherry in India. *Archives of Virology* 155: 2079-2082.
- Rao, W. L.; Zhang, Z. K.; Li, R. (2009): First report of *Cherry virus A* in sweet cherry trees in China. *Plant Disease* 93: 425.
- Rott, M. E.; Jelkmann, W. (2005): *Little cherry virus-2*: Sequence and genomic organization of an unusual member of the *Closteroviridae*. *Archives of Virology* 150: 107-123.
- Sabanadzovic, S.; Abou Ghanem-Sabanadzovic, N.; Rowhani, A.; Grant, J. A.; Uyemoto, J. K. (2005): Detection of *Cherry virus A*, *Cherry necrotic rusty motle virus* and *Little cherry virus 1* in California orchards. *Journal of Plant Pathology* 87: 173-177.
- Svanella-Dumas, L.; Marais, A.; Gentit, P.; Lamorte, J.; Candresse, T. (2005): First report on the natural occurrence of *Cherry virus A* in mirabelle plum (*Prunus domestica* var. *Insititia*) *Plant Disease* 89: 433.

7. Seznam použitých zkratek a symbolů

ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
APCLSV	<i>Apricot pseudo chlorotic leaf spot virus</i>
ASGV	<i>Apple stem grooving virus</i>
bp	base pairs, páry bází
cDNA	komplementární DNA
CGRMV	<i>Cherry green ring mottle virus</i>
CP	coat protein, plášťový protein
CVA	<i>Cherry virus A</i>
DAS-ELISA	double antibody sandwich ELISA
dEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELFO	elektroforéza
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
f-primer	forward primer, přímý primer
ICTVdB	the International Committee on Taxonomy of Viruses database
kb	kilobáze
kDa	kilodaltony
LChV-1	<i>Little cherry virus 1</i>
LiCLV	<i>Lilac chlorotic leafspot virus</i>
nm	nanometry
NSPV	<i>Nandina stem pitting virus</i>
nt	nukleotid(y)
ORF	otevřený čtecí rámeček, <i>open reading frame</i>
PBNSPaV	Plum bark necrosis stem pitting associated virus
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
PDO nested RT-PCR	Polyvalent Degenerated Oligonucleotide nested RT-PCR
PDV	<i>Prune dwarf virus</i>
r-primer	reverse primer, zpětný primer
RdRp	RNA dependentní RNA polymerasa

RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
RT	reverzní transkripce, <i>reverse transcription</i>
RT-PCR	reverse transcription - polymerase chain reaction, reverzní transkripce - polymerázová řetězová reakce
Taq polymeráza	termostabilní plymeráza
UV	ultrafialové záření, ultra-violet
(+)ssRNA	positive orientated single stranded RNA – pozitivně orientovaná jednovláknová RNA

8. Přílohy

8.1 Složení roztoků

5x TAE pufr

- Tris.....24,2 g
- Ledová kyselina octová.....5,71 ml
- 0,5 M EDTA.....10 ml

pH pufru 8,0 se upravuje kyselinou octovou, doplnění vodou do 1000 ml.

8.2 Příprava 1,5% agarózy

300 ml 1,5% agarózy

- Agaróza.....6 g
- 1x TAE.....300 ml

Směs 1x TAE pufru (nutno naředit pracovní roztok 5x TAE na 1x TAE) a agarózy je zahříváno, dokud nedojde k úplnému rozpuštění agarózy v 1x TAE pufru.