

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Kateřina Neumanová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Little cherry virus 1 (Closteroviridae),
jeho charakteristika a význam
v kulturním a planém patosystému
meruněk

Bakalářská práce

Kateřina Neumanová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Kateřina Neumanová

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou *Little cherry virus 1* (LChV-1) a jeho významem v kulturním a planém patosystému meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.).

V teoretické části je uvedena charakteristika a význam meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) a nejvýznamnějších chorob, které se u ní vyskytují. Následně je stručně popsána čeleď ssRNA⁺ virů *Closteroviridae* a její rody *Closterovirus*, *Crinivirus*, *Ampelovirus* a *Velarivirus*. Charakteristika zahrnuje popis morfologie a stavby genomu, okruh hostitelů a typy vektorů. Pozornost je věnována zejména charakteristice *Little cherry virus 1* (LChV-1) a chorob, se kterými je jeho výskyt asociován. V rámci charakteristiky LChV-1 je popsána jeho biologie, okruh hostitelů, geografický výskyt, způsob přenosu na hostitele, detekční metody, organizace genomu a genetická variabilita.

Experimentální část je zaměřena na studium výskytu *Little cherry virus 1* (LChV-1) v souboru 40 vzorků meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) ze 4 různých lokalit z jižní Moravy za použití dvojí kombinace primerů. Virus byl detekován na třech lokalitách ze čtyř a to konkrétně s frekvencí četnosti výskytu 37,5 %. V rámci studia genetické variability detekovaných izolátů byly získány parciální sekvence otevřeného čtecího rámce 8 (ORF8) a pláštěvého proteinu LChV-1, které při použití BLASTN vykazovaly největší identitu (86,99–99,51 %) s LChV-1 izoláty Apr153 (Acc. No. KX831094.1), Apr172 (KX831099.1), W2 (HE580104.1), ITMAR (EU715989.1) a Kyoto-2 (MG934545.1). Fylogenetickou analýzou parciálních sekvencí ORF8 a pláštěvého proteinu, za použití Neighbor-Joining metody, nebyla prokázána geografická ani hostitelská specifita LChV-1 izolátů.

Summary

This bachelor thesis is about a characterization of *Little cherry virus 1* (LChV-1) and its importance in the cultural and wild pathosystem of apricots (*Prunus armeniaca* L.).

In the theoretical part, there are presented the characterization and importance of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and the most significant diseases that occur on it. Subsequently, the family of ssRNA⁺ viruses *Closteroviridae* and its genera *Closterovirus*, *Crinivirus*, *Ampelovirus* and *Velarivirus* are briefly described. The characterization includes a description of morphology and genome structure, host range and types of vectors. Attention is devoted especially to the characterization of *Little cherry virus 1* (LChV-1) and the diseases whose occurrence is associated with. In terms of LChV-1 is described its biology, host range, geographical distribution, way of transmission to hosts, detection methods, genome organization and genetic variability.

The experimental part is focused on the study of the occurrence of *Little cherry virus 1* (LChV-1) in a collection of 40 samples of apricot (*Prunus armeniaca* L.) from four different locations in South Moravia using a two pairs of primers. The virus was detected at three locations out of four, specifically with a frequency of the occurrence 37,5 %. In the study of the genetic variability of the detected isolates were obtained partial sequences of the open reading frame 8 (ORF8) and the coat protein LChV-1, which showed by using BLASTN the highest identity (86,99–99,51 %) with LChV-1 isolates Apr153 (Acc. No. KX831094.1), Apr172 (KX831099.1), W2 (HE580104.1), ITMAR (EU715989.1) and Kyoto-2 (MG934545.1). The phylogenetic analysis of partial sequences of ORF8 and coat protein using Neighbor-Joining method did not prove any geographical or host specificity of LChV-1 isolates.

Poděkování:

Mé poděkování patří Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále děkuji všem členům Laboratoře molekulární biologie organismů, od nichž se mi dostalo cenných rad při zpracování experimentální části.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Charakteristika meruňky obecné (<i>Prunus armeniaca</i> L.).....	3
3.1.1	Choroby meruňky obecné.....	4
3.2	Charakteristika čeledi <i>Closteroviridae</i>	6
3.2.1	Rod <i>Closterovirus</i>	9
3.2.2	Rod <i>Crinivirus</i>	10
3.2.3	Rod <i>Ampelovirus</i>	11
3.2.4	Rod <i>Velarivirus</i>	12
3.3	<i>Little cherry virus 1</i> (LChV-1).....	13
4	Materiál a metody	20
4.1	Biologický materiál.....	20
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	21
4.4.1	Izolace RNA	21
4.4.2	Reverzní transkripce	22
4.4.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	23
4.4.4	Elektroforetická separace	25
4.4.5	Izolace PCR produktu z gelu	25
4.4.6	Sekvenování a bioinformatická analýza	26
5	Výsledky.....	27
5.1	Detekce LChV-1 a PPV	29
5.2	Fylogenetická analýza.....	31
6	Diskuze	34
7	Závěr.....	37
8	Literatura	38

Seznam symbolů a zkratek

Acc. No.	přístupové číslo („Accession number“)
ACLSV	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
BLASTN	„Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool“
BYSV	<i>Beet yellow stunt virus</i>
BYV	<i>Beet yellows virus</i>
BYVaV	<i>Blackberry yellow vein-associated virus</i>
cDNA	komplementární DNA
CoV-1	<i>Cordyline virus 1</i>
CP	plášťový protein major
CPm	plášťový protein minor
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
cv.	kultivar
dEPC	diethylpyrokarbonát
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
D-RNA	defektní RNA
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
ESFY	„ <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum“
GLRaV-1	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>
GLRaV-3	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>
GLRaV-7	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i>
Hel	helikáza
HSP70	„heatshock“ protein 70
HSP70h	homolog „heatshock“ proteinu 70
HTS	„high throughput sequencing“, sekvenování nové generace

ICTV	,International Committee on Taxonomy of Viruses‘
KBB	Katedra buněčné biologie a genetiky
LChD	,Little cherry disease‘, maloplodost třešní a višní
LChV-1	<i>Little cherry virus 1</i>
LChV-2	<i>Little cherry virus 2</i>
LIYV	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
LMBM	Laboratoř molekulární biologie mikroorganismů
L-PRO	,papain-like‘ proteáza
mRNA	mediátorová RNA
Mtr	metyltransferáza
NGS	sekvenování nové generace
ORF	otevřený čtecí rámec
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNRSV	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PřF	Přírodovědecká fakulta
PYVV	<i>Potato yellow vein virus</i>
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkripce s následnou PCR
ssRNA+	jednovláknová lineární pozitivně orientovaná RNA
ToCV	<i>Tomato chlorosis virus</i>
tRNA	transferová RNA
SPCSV	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
UTR	nepřekládaná oblast
UV	ultrafialové záření

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma struktury virové částice *Closteroviridae*.

Obrázek 2: Porovnání zdravých plodů (A) s plody infikovanými LChD (B).

Obrázek 3: Mapa výskytu *Little cherry virus 1*.

Obrázek 4: Schéma organizace genomu *Little cherry virus 1*.

Obrázek 5: Příklad listů meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) vybraných pro následné analýzy.

Obrázek 6: Detekce *Little cherry virus 1* (A) s primery dle Rotta *et* Jelkmanna (2001) a (B) s primery dle Glasy *et al.* (2015).

Obrázek 7: Příklad detekce *Plum pox virus* (PPV).

Obrázek 8: Fylogenetický strom izolátů LChV-1 sestavený na základě parciálních nukleotidových sekvencí ORF8.

Obrázek 9: Fylogenetický strom izolátů LChV-1 sestavený na základě parciálních nukleotidových sekvencí plášťového proteinu.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci pro 1 test.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR reakci pro 1 test.

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace.

Tabulka 5: Seznam testovaných vzorků.

1 Úvod

Virová onemocnění peckovin se řadí mezi závažné problémy týkající se převážně komerčních výsadeb, kde způsobují radikální pokles ve výnosu a kvalitě plodů, a mají tedy výrazný negativní ekonomický důsledek na pěstitele. Základní metodou pro ochranu peckovin před virovými chorobami je kontrola šlechtitelského materiálu a zabránění rozšiřování virů hmyzími vektory.

Mezi významné virové patogeny peckovin se řadí *Little cherry virus 1* (LChV-1) z čeledi *Closteroviridae*, který byl identifikován jako jeden z původců choroby ‚Little cherry disease‘ (LChD), vyskytující se primárně na třešni obecné (*Prunus avium* (L.) L.) a višni obecné (*Prunus cerasus* L.), u kterých způsobuje typické příznaky jako je maloplodost, blednutí či deformace plodů nebo zakrnělý růst a zbarvení listů do bronzova až červena. V posledních letech byl ale okruh hostitelů LChV-1 rozšířen na další zástupce rodu *Prunus*, které patří mezi významné kulturní peckoviny, např. slivoň švestka (*Prunus domestica* L.), broskvoň obecná (*Prunus persica* (L.) Batsch) či meruňka obecná (*Prunus armeniaca* (L.) L.), ve kterých se virus nejčastěji vyskytuje v latentní podobě. Vektor LChV-1 stále není znám, proto můžeme pouze odhadovat, jakým způsobem se daný virus rozšiřuje na další potencionální hostitele.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše shrnující aktuální poznatky o hostitelském okruhu, výskytu a genetické variabilitě původců choroby maloplodosti třešní.
2. Izolace RNA, detekce viru pomocí RT-PCR a elektroforetické separace, sekvenování PCR produktů, bioinformatická analýza.
3. Skríníng výskytu *Little cherry viru 1* v kulturním patosystému s důrazem na meruňku obecnou (*Prunus armeniaca*) a srovnání používaných detekčních metod. Molekulární charakteristika detekovaných izolátů.

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.)

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L., syn. *Armeniaca vulgaris* Lam. a *Prunus armeniaca* var *vulgaris* Zabel) je řazena do řádu růžotvaré (*Rosales*), čeledi růžovité (*Rosaceae*) a rodu slivoň (*Prunus*) (Integrated Taxonomic Information System, 2018). Mezi další významné zástupce rodu *Prunus* se řadí švestka domácí (*Prunus domestica* L.), višěň obecná (*Prunus cerasus* L.), třešeň obecná (*Prunus avium* (L.) L.), broskvoň obecná (*Prunus persica* (L.) Batsch) či mandloň obecná (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) (The Plant List, 2018).

Meruňka je tradiční kulturní ovocná plodina, která má svůj původ ve starověké Číně, kde nacházíme první zmínku o jejím pěstování okolo roku 2000 před naším letopočtem. Odtud se rozšířila přes Střední Asii, Írán do Malé Asie a Zakavkazska, odkud se díky příhodnému subtropickému klimatu dostala k břehům jižní Evropy, konkrétně do Řecka, kde dostala název arménské jablko. Ve středoevropských zemích se vyskytuje od 14. století (Hladík *et al.*, 1966).

Meruňka obecná je opadavá dřevina, která může dorůst výšky až 30 m, ale běžně pěstované kultivary dosahují výšky mnohem menší. Ušlechtilé odrůdy meruněk se roubojí, nebo očkují na podnože vypěstované ze semene, nejpoužívanější je meruňkový semenáč, nebo se množí vegetativním způsobem, tj. řízkováním a oddělky. Meruňkový semenáč vytváří rozsáhlou kořenovou soustavu, která jde do hloubky i do šířky. Habitus koruny závisí na růstových podmínkách a na vlastnostech odrůdy. Samotný tvar může být kuželovitý, kulatý, plochý až převislý. Listy jsou oválné až eliptické, 5 až 7,5 cm dlouhé. Květy mají růžové zbarvení, ale při plném vykvetení jsou bílé barvy. K vykvetení dochází poměrně brzy, proto jsou meruňky citlivé na chladné klimatické podmínky a často dochází k poškození květů a pupenů mrazem. Vykvetení závisí na teplotě vzduchu, kdy průměrná teplota po několik dní činí 10 °C. Plody jsou převážně oranžové barvy, ale mohou být i žluté, bílé nebo načervenalé, kulatého či oválného tvaru. Slupka plodu je ochmýřena. Tvrdá pecka je obklopena měkkou a šťavnatou, obvykle oranžovou dužninou (Encyclopedia of Life, 2018; Hladík *et al.*, 1966).

Pěstování meruněk má v České republice dlouhou tradici. Lidé je pěstují na zahradách pro osobní použití, ale i v ovocných sadech pro komerční využití. V České republice

se v roce 2017 celkově vyskytovalo 1 313 402 stromů meruňky, což byl šestý nejpočetnější ovocný strom či keř u nás, a roční spotřeba meruněk je 1,6 kg na osobu (Buchtová, 2018). Komerční pěstitele meruněk s největší rozlohou sadů se vyskytují na jižní Moravě (např. Vizovice, Kobylí na Moravě, Prosiměřice, Jaroslavice). Naopak v Čechách a na severní Moravě můžeme nalézt rozlohou menší sady, které mají spíše samozásobitelskou funkci (Ovocnářská unie České republiky, 2018). Původní odrůdy pěstované v Evropě jsou kultivary meruňky obecné. Odrůdy v Asii jsou naopak odvozené od meruňky mandžuské (*Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne), m. sibiřské (*P. sibirica* L.), m. tibetské (*P. holosericea*), m. korejské (*P. ansu* (Maxim.) Kom.) a m. japonské (*P. mume* (Siebold & Zucc.)). Moderní odrůdy vznikly křížením asijských kultivarů s meruňkou obecnou (Dvořák *et al.*, 1978; Hladík *et al.*, 1966; Jan, 2011).

Hospodářský a kulturní význam meruněk spočívá v jejich plodech, které jsou spotřebiteli žádané pro svou lahodnou chuť. Plody se uplatňují jako konzumní ovoce, ale zároveň se zpracovávají na ovocné šťávy, zavařeniny, marmelády či džemy a dětské přesnídávky. Meruňky se mohou sušit, kandovat a některé domácnosti plody uchovávají i mražením. Plody meruňky jsou pro člověka přínosné i z hlediska výživy, jelikož mají vysoký obsah vitamínu A, vitamínu C i vybraných minerálů, např. vápníku, železa nebo fosforu. Nezpracovává se jenom dužnina, ale i samotné jádro, ze kterého se získává meruňkový olej využívaný v kosmetickém průmyslu. Není ale doporučováno jádra konzumovat, jelikož obsahují amygdalin, který se během metabolismu přeměňuje na jedovatý kyanid (Encyclopedia of Life, 2018; Jan, 2011).

3.1.1 Choroby meruňky obecné

Meruňky jsou napadány bakteriálními, houbovými, fytoplazmovými i virovými patogeny. Mezi významné bakteriózy lze zařadit bakteriální nádorovitost způsobenou bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a rakovinné odumírání větví peckovin, které způsobuje směšná infekce bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* a hub *Leucostoma cincta* (běloterčka řešetláková) a *Leucostoma perooni*. U bakteriální nádorovitosti pozorujeme vznik nádorů různých velikostí na kořenech, kořenovém krčku i na místech srůstu podložky s roubem. Napadené stromy zpomalují svůj růst, mají nižší výnos plodů a postupně odumírají. Dříve se choroba nejvíce vyskytovala ve školkách, odkud se přenášela do výsadeb (Benada *et al.*,

1962). Mezi symptomy rakovinného odumírání větví peckovin se řadí výskyt tmavě zbarvených míst na větvích a kmenech, které se mírně propadají a postupně nekrotizují. Nekrotické skvrny se postupně zvětšují a zasahují vodivá pletiva, což způsobuje, že části nad postiženými místy vadnou a postupně usychají. Na postižených místech se projevuje silný klejotok, tj. rostlinný exsudát podobný pryskyřici (Hluchý *et al.*, 1997; Hričovský *et al.*, 2004; Rod, 2008).

Hlavními houbovými patogeny jsou houba *Gnomonia erythrostoma f. sp. armeniaca*, houba *Monilia laxa* (hlízenka chabá) způsobující moniliózu, houba *Venturia carpophila* spojována se strupovitostí peckovin a houba *Wilsonomyces carpophilus*, původce suché skvrnitosti listů. *Gnomonia erythrostoma f. sp. armeniaca* je specializovaná forma patogenu, která napadá pouze meruňku obecnou a způsobuje hnědnutí listů meruňky. Tato choroba se projevuje neohrazenými žlutozelenými skvrnami na čepelích listů, které se neustále zvětšují, a hnědnutím žilek na rubu listů (Hluchý *et al.*, 1997; Hričovský *et al.*, 2004; Rod, 2008). Houba *Monilia laxa* (hlízenka chabá) napadá květy, u kterých ničí pestík, ale okvěti zůstává zachováno. Příznaky napadení květu připomínají poškození mrazem. Dále se infekce šíří do dřeva větví a ty následně vadnou a usychají. U plodů se tato choroba nazývá moniliová hniloba plodů peckovin, která se vyznačuje měknutím a hnědnutím dužiny napadeného plodu a na jeho pokožce se postupně objevují šedé povlaky (Benada *et al.*, 1962; Rod, 2008). Při strupovitosti peckovin se na plodech vytváří drobné, okrouhlé olivověšedé až šedočerné skvrny, jejichž počet narůstá do té doby, dokud nevytvoří souvislé šedočerné plochy. Často jsou postiženy plody ve spodních částech koruny v zahuštěných výsadbách. Tyto plody mohou být následně napadány moniliovou hnilobou. Podobné skvrny jako u strupovitosti peckovin se vyskytují i u suché skvrnitosti listů, ale nejsou napadány plody, ale listy. Mezi zdravým a napadeným pletivem se vytváří oddělovací vrstva a nekrotizovaná pletiva odpadávají. Může to vést až k rozpadu listů a jejich předčasnému opadání (Benada *et al.*, 1962; Hluchý *et al.*, 1997).

Velkým problémem se stalo předčasné hynutí meruněk, neboli apoplexie meruněk, které je díky svým symptomům přirovnáváno k mrtvici. Je to choroba s náhlým akutním průběhem, kdy dochází bez jakýchkoliv předchozích příznaků ve velmi krátkém čase k zvadnutí a odumření zdánlivě zdravých stromů. Existuje i forma chronická, která je dokonce častější než forma akutní (Benada *et al.*, 1962).

Mezi patogeny meruněk se řadí i fytoplazmy, což jsou jednoduché nehelikální prokaryotní organismy bez buněčné stěny. Významným fytoplazmovým patogenem meruněk

je fytoplazma ‚*Candidatus Phytoplasma prunorum*‘, fytoplazma evropské žloutenky peckovin (ESFY), která způsobuje svinutí a žloutnutí celých listů, nebo pouze jejich částí. Dále dochází ke zhoršení růstu a předčasnému opadu listů a plodů. Může se vyskytovat i náhlé odumření větví. Napadená rostlina obvykle uhynie do jednoho roku (Navrátil *et al.*, 2008).

Nejčastějšími virózami meruněk jsou šarka způsobená virem šarky švestky (*Plum pox virus*), nekrotická kroužkovitost třešně způsobená virem *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) a chlorotická skvrnitost jabloně spojovaná s virem *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Typickým symptomem šarky je prosvětlování žilek na začátku sezóny (začátek července) na mladých listech, ale se stoupajícími teplotami tento symptom mizí. Dále se vytvářejí kroužky na peckách a někdy se objevují i na plodech. Různé odrůdy meruněk reagují na šarku různě. U senzitivních kultivarů meruněk dochází při vysokých teplotách až k deformaci plodu (Diekmann *et Putter*, 1996; Benada *et al.*, 1962; Schlesingerová, 2011). Nekrotická kroužkovitost třešně vyvolaná infekcí PNRSV postihuje především třešně a višně, ale vyskytuje se i na meruňkách a dalších peckovinách. Pokud je strom napaden tímto virem, můžeme na čepelích listů sledovat chlorotické ohraničené skvrny, drobné kroužky nebo proužky. Následně dochází k jejich deformaci a nekrotizaci. *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) způsobuje retardaci růstu a snížení výnosů (Hluchý *et al.*, 1997; Ogawa *et English*, 1991). Chlorotická skvrnitost jabloně se vyskytuje nejen na jabloních, ale i na zástupcích rodu *Prunus* jako je meruňka, broskvoň, třešeň a višeň. Mezi symptomy se řadí světlezelené skvrny, kresby na listech a jejich celková deformace. Dochází i k jejich předčasnému opadu. U jabloní se ACLSV vyskytuje v latentní podobě bez příznaků, typické příznaky na listech jsou pozorovány spíše u hrušní, broskvoní a meruněk (Diekmann *et Putter*, 1996; Hluchý *et al.*, 1997; Verma *et Sharma*, 1999).

3.2 Charakteristika čeledi *Closteroviridae*

Virová čeleď *Closteroviridae* byla ustanovena v roce 1996 (ICTV, 2018) a její název byl odvozen na základě morfologie virových částic jejich zástupců, kdy *closter* znamená v řečtině nit' nebo vlákno. Tato čeleď obsahuje velký počet zástupců rostlinných virů, kteří způsobují snížení výnosu hospodářských plodin, mezi které patří například višně, třešně,

meruňky a vinná réva, a proto se staly předmětem zájmu fytopatologů na celém světě (Martelli *et al.*, 2002).

Viry, patřící do této čeledi, mají neobalené částice vláknitého tvaru s molekulami plášťového proteinu stočeného do šroubovice a dosahující délky od 650 nm (rody s fragmentovaným genomem) do 2000 nm (rody s nefragmentovaným, monopartitním genomem) s průměrem 12 nm, viz obrázek 1. Jedna otočka šroubovice je tvořena 10 proteinovými podjednotkami a středový prostor, ve kterém se nachází RNA, má průměr 3–4 nm. Virová částice je tvořena dvěma typy plášťového proteinu, CP major (CP) a CP minor (CPm) (Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996; ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2002).



Obrázek 1: Schéma struktury virové částice *Closteroviridae* (převzato a upraveno z ViralZone, 2019).

Genom je tvořen jednou lineární jednovláknovou molekulou RNA, která je pozitivně orientována a na svém 5'-konci má metylovanou nukleotidovou čepičku. 3'-konec není polyadenylován a ani neobsahuje žádnou strukturu podobající se tRNA, ale nese několik vlásenek a pseudouzels, které jsou nezbytné pro virovou replikaci. Samotná velikost genomu odpovídá velikosti virové částice a pohybuje se v rozmezí od 13 000 do 19 000 nukleotidů (Bar-Joseph *et al.*, 1997; ICTV, 2018).

Zástupci čeledi *Closteroviridae* jsou rozdělováni do několika genetických skupin, které vykazují v důsledku silné negativní selekce velmi nízkou genetickou variabilitu. Největší genetickou variabilitu vykazují ampeloviry napadající révu vinnou (např. *Grapevine leafroll-associated virus 1, 4 a 11*) a closterovirus *Grapevine leafroll-associated virus 2*. Oproti tomu criniviry představují rod s velmi nízkou genetickou variabilitou (Rubio *et al.*, 2013). Zdrojem genetické variability u *Closteroviridae* jsou dinukleotidové repetice, které

jsou u těchto virů nejrozšířenějším typem mikrosatelitů, uvažuje se i o jejich důležité roli při organizaci genomu (Biju *et al.*, 2015).

Okruh přirozených i experimentálních hostitelů *Closteroviridae* bývá omezený a samotné viry se vyskytují v regionech s mírným nebo subtropickým klimatem. *Closteroviridae* jsou přenášeny semiperzistentně, tzn., že virus prochází zaživacím traktem do slinných žláz vektora, odkud se přenáší do možných hostitelů do té doby, než se vyčerpá obsah všech nasátých virových částic ve slinných žlázách. Mezi přirozené vektory patří mšice, molice, vlnatky a červci. Tyto viry mohou být přenosné i mechanicky, ale u většiny jejich zástupců byl tento přenos neúspěšný, *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7) a *Little cherry virus 1* (LChV-1) byl úspěšně experimentálně přenesen pomocí kokotice. Na dlouhé vzdálenosti se virus šíří prostřednictvím vegetativního rozmnožování. Přenos pomocí semen nebyl zatím prokázán. Zástupci čeledi *Closteroviridae* způsobují řadu onemocnění, která jsou často způsobená směsnou infekcí různých virů, nebo kmeny stejného viru (ICTV, 2018; Jarugula *et al.*, 2010; Rubio *et al.*, 2013).

Čeď *Closteroviridae* byla ustanovena v roce 1998 a původně obsahovala dva rody: *Closterovirus* a *Crinivirus*, jejichž hlavní rozdíl spočíval v přítomnosti monopartitního nebo bipartitního genomu. Mezi první viry zařazené do této čeledi patřil *Beet yellows virus* (BYV) a *Citrus tristeza virus* (CTV) (Bar-Joseph, 2014; Martelli *et al.*, 2002). Později se změnil přístup ke klasifikaci čeledi a jednotliví zástupci byli přerozděleni podle druhu hostitele a vektora. V roce 2002 byl přidán rod *Vinivirus*, pojmenovaný podle přirozeného hostitele *Vitis vinifera* (réva vinná) a posléze byl přejmenován na rod *Ampelovirus* (Martelli *et al.*, 2002). Nejnovějším rodem je rod *Velarivirus*, který byl vytvořen po objevu molekulárního charakteru *Cordyline virus* (CoV-1), a byl do něj zařazen *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7) a *Little cherry virus 1* (LChV-1) (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2012).

Podle ICTVdb (ICTV, 2018) je současná klasifikace virů do druhů a rodů v této čeledi založena na těchto demarkačních kritériích:

- Morfologie, struktura a velikost virových částic.
- Velké pozitivně orientované jednovláknové RNA genomy s organizací odlišnou od jiných rostlinných virů.
- Výskyt unikátních genů kódujících homolog buněčného ‚heatshock‘ proteinu HSP70 (HSP70h) a duplikované kopie genu pro plášťový protein CPm.

- Blízké fylogenetické vztahy proteinů využívaných při replikaci, tj. metyltransferáza (Mtr), helikáza (Hel) a RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp).
- Strategie genomové exprese založená na ribozomálním posunu, proteolytickém zpracování a produkci subgenomických mRNA.
- Indukce specifických cytopatických struktur v infikovaných buňkách, skládajících se z cytoplazmatických seskupení virionů spojených s jednotlivými nebo spojenými membránovými vezikuly.
- Specifický tkáňový tropismus (např. floém).
- Přírozený přenos pomocí mšic, molic, vlnatek nebo červců semiperzistentní cestou, experimentální přenos pomocí mechanické inokulace je obtížný, nebo nemožný.
- Méně než 75% aminokyselinová identita pro plášťový protein (CP), RNA-dependentní RNA polymeráza (RdRp) a ‚heatshock‘ protein (HSP70h).

3.2.1 Rod *Closterovirus*

Rod *Closterovirus* byl taxonomicky ustanoven na zasedání ‚International Committee on Taxonomy of Viruses‘ (ICTV) v roce 1975 v Madridu a typovým zástupcem tohoto rodu se stal *Beet yellows virus* (BYV) (ICTV, 2018).

Viriony dosahují obvykle délky v rozmezí 1 350–2 000 nm. *Citrus tristeza virus* (CTV) obsahuje také částice menší, než je jeho plná délka, a ty mohou sloužit k obalení subgenomických nebo vícenásobných druhů defektních RNA (D-RNA), obsahující všechny *cis* působící sekvence potřebné k replikaci (Bar-Joseph *et al.*, 2013; ICTV, 2018). Většinu délky virové částice tvoří plášťový protein CP (22–25 kDa) a vedlejší plášťový protein CPm (24–27 kDa) tvoří krátký segment (cca 75 nm) na konci částice. Gen kódující CPm je umístěn před genem kódující CP (Martelli *et al.*, 2002).

Genom je tvořen jednovláknovou lineární pozitivně orientovanou molekulou RNA (ssRNA+) o velikosti 14,5 až 19,3 kb. Zástupci rodu *Closterovirus* vykazují 3 typy organizace genomu, které jsou charakteristické pro jejich typické zástupce: *Beet yellows virus* (BYV), *Citrus tristeza virus* (CTV) a *Beet yellow stunt virus* (BYSV). BYV obsahuje 8 otevřených čtecích rámců (ORFs) ohraničených 5'- a 3'- UTR oblastmi. CTV má 12 ORFs, opět ohraničenými 5'- a 3'- UTR oblastmi, ale jiné velikosti. CTV se od BYV liší tím, že obsahuje dvě domény pro ‚papain-like‘ proteázu (ORF1a), dále ORF2 kóduje

33 kDa produkt, který není podobný žádnému proteinu v databázi, a obsahuje navíc ORF9 a ORF11. BYSV obsahuje 10 ORFs, ohraničených UTR oblastmi o velikosti průměru mezi UTR oblastmi BYV a CTV. Na rozdíl od BYV *Beet yellow stunt virus* (BYSV) obsahuje ORF2, které kóduje 30 kDa polypeptid, který není podobný žádnému jinému známému proteinu. Organizace genomu BYSV je přechodný stav mezi organizací BYV a CTV, což naznačuje, že tyto tři viry mohou představovat tři etapy v evoluci rodu *Closterovirus* (ICTV, 2018; King *et al.*, 2011; Pappu *et al.*, 1997).

Zástupci v tomto rodě infikují převážně bylinné hostitele (plevele, zeleninu a květiny) nebo keře (maliník) a dřeviny. Mezi hlavní symptomy se řadí deformace listů a jejich zežloutnutí či zčervenání a vrásčitost na kmeni nebo stonku. Viry tohoto rodu se přenášejí pomocí mšic semiperzistentní cestou, někteří zástupci mají široké spektrum vektorů, jiné přenáší pouze jeden specifický druh mšice (např. *Carnation necrotic fleck virus*, *Wheat yellow leaf virus*). Některé druhy mohou být přenášeny s jistými obtížemi mechanickou inokulací (např. *Citrus tristeza virus*, *Grapevine leafroll-associated virus 2*), ale žádný zástupce není přenášen semeny. Může docházet k přenosu pomocí vegetativního rozmnožování, tj. očkování (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2002).

3.2.2 Rod *Crinivirus*

Rod *Crinivirus* byl vytvořen v roce 1996, ale svůj název dostal až na podzim roku 1997 na základě vláknitého tvaru virionů připomínajících pramínek vlasů dle latinského slova *crinis* (vlas). Typovým zástupcem je *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (ICTV, 2018; King *et al.*, 2011).

Pro criniviry jsou charakteristické dva typy virionů, viriony o délce 650–850 nm a 700–900 nm. Svoji délkou se řadí mezi nejmenší viriony z celé čeledi *Closteroviridae*. (Loebenstein *et Lecoq*, 2012; Martelli *et al.*, 2002).

Bipartitní genom velké části zástupců rodu *Crinivirus* je tvořen dvěma ssRNA⁺ (RNA-1 a RNA-2) s celkovou velikostí 15,6–17,9 kb, které jsou samostatně obalené. V rámci rodu *Crinivirus* ale můžeme nalézt jednu výjimku, kterou je *Potato yellow vein virus* (PYVV), jehož tripartitní genom je tvořený RNA-1, RNA-2 a RNA-3. Pro infekci jsou zapotřebí všechny molekuly RNA, které tvoří genom. Všichni zástupci rodu *Crinivirus* mají

v genomu umístěný gen pro CPm za genem pro plášťový protein CP (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2002; Muñoz Baena *et al.*, 2016).

Criniviry napadají primárně bylinné hostitele, u kterých způsobují rozsáhlé chlorózy společně doprovázené zpomalením růstu rostliny, až úplnou zakrňlostí. Jsou přenášeny semiperzistentně pomocí molic rodu *Trialeurodes*, např. molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*), která přenáší *Potato yellow vein virus* (PYVV) nebo *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), a molic rodu *Bemisia*, např. molice bavlníková (*Bemisia tabaci*) přenášející *Tomato chlorosis virus* (ToCV) či *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). Žádný ze zástupců není přenášen pomocí semen ani mechanickou inokulací (ICTV, 2018; King *et al.*, 2011).

3.2.3 Rod *Ampelovirus*

Rod *Ampelovirus* byl ustanoven v roce 2002 a jeho název byl odvozen od řeckého slova *ampelos*, vinná réva, jelikož réva je typickým hostitelem tohoto rodu. Typovým zástupcem je *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) (ICTV, 2018; King *et al.*, 2011).

Virové částice zástupců tohoto rodu mají délku 1 400–2 000 nm. Morfologie virionů je do značné míry shodná s ostatními rody v čeledi *Closteroviridae* (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2002).

Viriony obsahují lineární pozitivně orientovanou jednovláknovou molekulu RNA o velikosti 13–18,5 kb. Rod *Ampelovirus* vykazuje širokou variabilitu ve velikosti genomu i jeho organizaci. Zástupce tohoto rodu dělíme dle organizace genomu na dvě skupiny, na typ *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) a *Little cherry virus 2* (LChV-2). Tyto dva typy se od sebe liší polohou genu pro plášťový protein CP a CPm, kdy u virů typu GLRaV-3 gen pro CPm leží za genem pro CP, naopak u virionů typu LChV-2 se gen pro CPm nachází o pět otevřených čtecích rámců dříve než gen pro CP. GLRaV-3 má také největší genom z celého rodu *Ampelovirus*. Výjimkou je *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), který nese dvě kopie CPm (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2002).

Zástupci rodu *Ampelovirus* napadají většinou dřevinné hostitele (réva vinná, slivoň švestka a fíkovník), ale také ananas. U hostitelů vyvolávají žloutnutí a zčervenání listů (u vinné révy), tvorbu vrásčitosti na kmenech či stonku (slivoň švestka), chřadnutí rostliny, nebo může

být infekce bez příznaků (ananas). K přenosu dochází semiperzistentní cestou a jejich přirozenými vektory jsou červci, např. puklice (*Parthenolecanium*, *Pulvinaria*, *Neopulvinaria*), vlnatky (*Pseudococcus*, *Planococcus*, *Dysmicoccus*, *Phenacoccus*). Ampeloviry jsou přenášeny velkým množstvím druhů červců, ale například *Little cherry virus 2* je přenášen pouze pomocí červce javorového (*Phenacoccus aceris*) a ampeloviry napadající ananas jsou přenášeny výhradně dvěma druhy rodu *Dysmicoccus*. Ampeloviry mohou být přenášeny i na velké vzdálenosti pomocí vegetativního rozmnožování, ale přenos semeny nebo mechanicky není znám (ICTV, 2018; King *et al.*, 2011).

3.2.4 Rod *Velarivirus*

Rod *Velarivirus* je nejmladším členem čeledi *Closteroviridae* a byl ustanovený v roce 2013. Svůj název dostal dle latinského slova *velari*, skrytý či záhadný, jelikož některé choroby způsobené virem patřící do tohoto rodu mohou být bezpříznakové, tedy pro pozorovatele skryté (ICTV, 2018; Martelli *et al.*, 2012).

Původně byly do rodu zařazeny *Little cherry virus 1* (LChV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7) a *Cordyline virus 1* (CoV-1), kteří se dříve řadily do skupiny nezařazených virů čeledi *Closteroviridae*. Do současnosti bylo popsáno sedm zástupců: *Areca palm velarivirus 1*, *Cordyline virus 1–4*, *Grapevine leafroll-associated virus 7*, *Little cherry virus 1* (ICTV, 2018).

Viriony jsou neobalené, vláknitého tvaru o délce v rozmezí 1 500–1 700 nm. Tělo virionu je tvořeno z plášťového proteinu CP a konec částice z plášťového proteinu CPm (ViralZone, 2019).

Genom je monopartitní a je tvořen lineární jednovláknovou pozitivně orientovanou molekulou RNA o velikosti 16–17 kb. 5'-konec pravděpodobně obsahuje metylovanou nukleotidovou čepičku a na 3'-konci se nevyskytuje polyadenylový konec. Genom kóduje 10 proteinů (Al Rwahnih *et al.*, 2012; ViralZone, 2019)

Vektor těchto rostlinných virů není znám (ICTV, 2018; ViralZone, 2019).

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

Little cherry virus 1, zástupce rodu *Velarivirus*, čeledi *Closteroviridae*, byl spojen s chorobou zvanou ‚Little cherry disease‘ (LChD), neboli maloplodost třešní a višní. Tato choroba může být vyvolaná jedinečnou nebo směsnou infekcí navzájem nepříbuznými patogeny, které jsou od sebe symptomaticky těžko oddělitelné a původně se nijak nerozlišovaly. ‚Little cherry disease‘ je tedy způsobována infekcí *Little cherry virus 1* (LChV-1), *Little cherry virus 2* (LChV-2) a Western X disease fytoplazmou (Katsiani *et al.*, 2015; WSU Tree Fruit, 2019).

Původ patogenů můžeme nalézt u okrasných třešní, u kterých LChD nezpůsobuje žádné viditelné příznaky, proto většinou zůstává infekce nedagnostikována a může se přenášet na další hostitele. Primárně se LChD vyskytuje na višních a třešních, přesto byly prokázány nálezy i na ostatních zástupcích rodu *Prunus*, na kterých infekce nezpůsobuje žádné viditelné příznaky, a patogeny se zde vyskytují v latentní podobě (Katsiani *et al.*, 2015; Matic *et al.*, 2009b; WSU Tree Fruit, 2019).

Mezi hlavní symptomy LChD řadíme maloplodost a blednutí plodů, zhoršení jejich kvality a snížení koncentrace cukru v plodech. Plody jsou malé, deformované a tečkované (obrázek 2). Příznaky na listech se projevují až v pozdějším létě či na podzim, kdy dochází ke zbarvení do červena či bronzova. U napadených stromů také dochází ke zpomalení růstu až k zakrnělosti. LChD tedy způsobuje výrazné snížení výnosu stromů a má silný negativní ekonomický důsledek pro pěstitele (CABI, 2019; Matic *et al.*, 2009b; Ludvíková *et al.*, 2011).



Obrázek 2: Porovnání zdravých plodů (A) s plody infikovanými LChD (B) (převzato a upraveno z CABI, 2019).

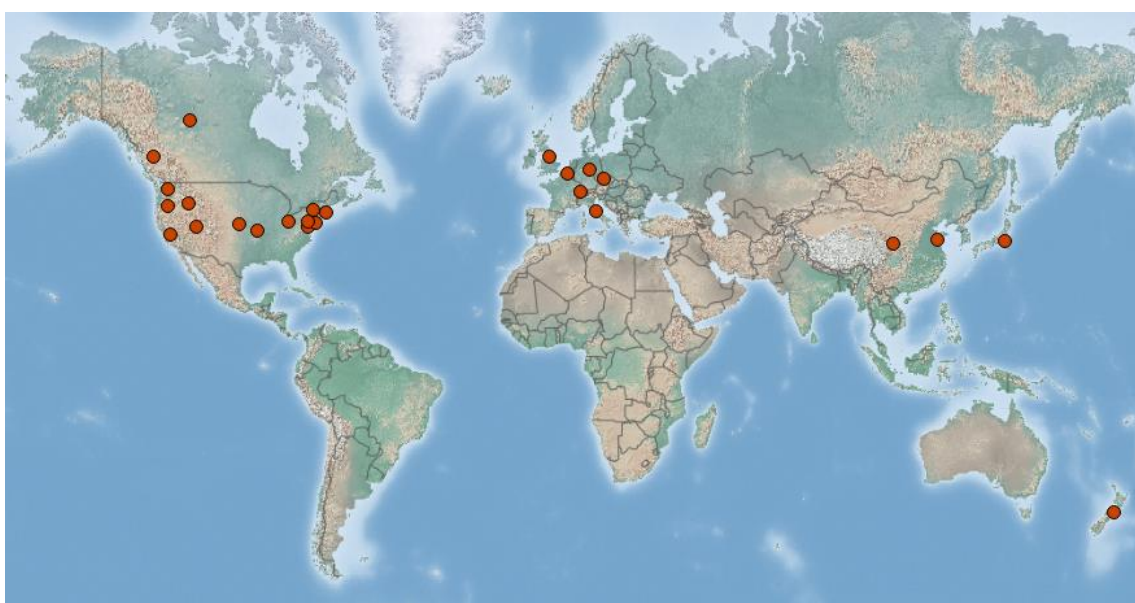
Bylo prokázáno, že infekce LChV-1 způsobuje i další choroby jako je ‚Kwanzan stunting‘ syndrom a ‚Shirofugen stunt‘. Obě choroby se vyskytují na kultivarech sakury ozdobné (*Prunus serrulata* Lindl.) u kultivaru Kwanzan a Shirofugen. Infekce mají společné symptomy, mezi které se řadí: zakrnělost a deformace listů, postupující nekróza ve svazcích a uhynutí rostliny po několika vegetačních cyklech. *Little cherry virus 1* byl u ‚Kwanzan stunting‘ syndromu prokázán pomocí elektronové mikroskopie a potvrzen pomocí metody RT-PCR se specifickými primery. Asociace LChV-1 s ‚Shirofugen stunt‘ byla dokázána pomocí sekvenování a následného porovnání sekvencí s již známými izoláty LChV-1. Od těchto izolátů se ale v určitých částech liší a je tedy pravděpodobné, že se jedná o evolučně odlišný izolát (Candresse *et al.*, 2012; Kunze *et al.*, 1982; Matic *et al.*, 2009b).

Little cherry virus 1 kolonizuje floém hostitelů. Pomocí elektronové mikroskopie byla u infikovaných stromů prokázána přítomnost vláknitých virionů ve floémovém parenchymu a v doprovodných buňkách hlavní žíly čepele listu a řapíku (Raine *et al.*, 1975; 1979).

Současný okruh hostitelů zahrnuje zástupce rodu *Prunus*. Mezi nejcitlivější hostitele se řadí třešeň obecná (*Prunus avium* (L.) L.), ale viditelné symptomy infekce LChV-1 můžeme zaznamenat i u višně obecné (*P. cerasus* L.) a slivoně pensylvánské (*P. pensylvanica* L. f.). Dále bývají spíše latentně infikovány okrasné třešně, např. višeň vyříznutá (*P. incisa* Thunb.), sakura obecná (*P. serrulata* Lindl.), *P. sieboldii* (CarriŠre) Wittm., třešeň chloupkatá (*P. subhirtella* Miq.) a slivoň jezojská (*P. yedoensis* Matsum.). Dalšími tolerantními hostiteli jsou: slivoň vykrajovaná (*P. emarginata* (Douglas ex Hook.) Walp.), višeň turecká (*P. mahaleb* L.), višeň plstnatá (*P. tomentosa* Thunb.), broskvoň obecná (*P. persica* (L.) Batsch), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.), slivoň švestka (*P. domestica* L.). S výjimkou divokých odrůd třešní (*P. emarginata* (Douglas ex Hook.) Walp. a *P. pensylvanica* L. f.) jsou všechny tyto hostitelské rostliny pěstovány v Evropě jako ovocné stromy nebo okrasné dřeviny (EPPO, 2019; Wang *et al.*, 2016; Welsh *et al.*, 1976).

Poprvé byl LChV-1 popsán v Německu (Keim-Konrad *et al.*, 1996) a následně ve Švýcarsku, Nizozemsku a Velké Británii (Vitushkina *et al.*, 1997). Od roku 1997 byl LChV-1 zjištěn v mnoha zemích Evropy, severní Ameriky (Rott *et al.*, 2001) ale i v zemích Asie. Infikované třešně byly detekovány také v Polsku (Komorowska *et al.*, 2004), Japonsku (Isogai *et al.*, 2004), Itálii (Matic *et al.*, 2007), Španělsku

(Ruiz-Garcia *et al.*, 2016), Číně (Wang *et al.*, 2016), Chile (Fiore *et al.*, 2018), Korey (Cho *et al.*, 2018), ale i v České republice (Ludvíková *et al.*, 2011) a na Slovensku (Glasa *et al.*, 2015). Později bylo zjištěno, že LChV-1 může infikovat i jiné hostitele. *Little cherry virus 1* byl nalezen na švestkách ve Francii (Marais *et al.*, 2016) a Belgii (Tahzima *et al.*, 2016), na broskvoních v Itálii (Matic *et al.*, 2007) a jako nejnovější hostitel byly v České republice identifikovány meruňky (Šafářová *et al.*, 2017), tento nález byl následně potvrzen detekcí LChV-1 v Maďarsku (Barath *et al.*, 2018). Výskyt LChV-1 je demonstrován na obrázku 3.



Obrázek 3: Mapa výskytu *Little cherry virus 1* (převzato z CABI, 2019).

Legenda: červené body: místo detekce LChV-1

Přirozený vektor pro LChV-1 je stále neznámý, stejně jako pro ostatní zástupce rodu *Velarivirus*. Virus je ale přenosný vegetativně pomocí roubování a rozšiřuje se tedy společně s infikovaným rostlinným materiálem (Katsiani *et al.*, 2015). Experimentálně byl LChV-1 přenesen pomocí kokotice evropské (*Cuscuta europaea* L.) z infikované třešně na *Nicotiana occidentalis*. Hostitel za 6 měsíců po přenosu projevoval symptomy jako je stáčení listů, zčervenání listových okrajů a žil, zavadnutí a nižší vegetační růst (Jelkmann *et al.*, 2010).

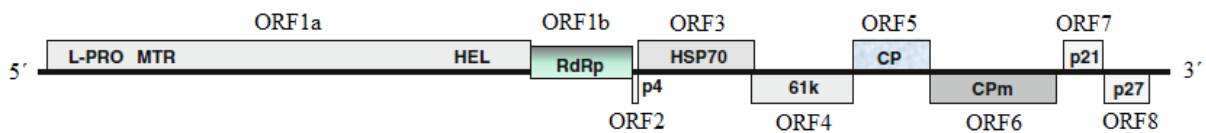
Pro detekci LChV-1 se využívá převážně molekulárních metod jako je RT-PCR a následná vizualizace produktů pomocí elektroforetické separace, Sangerovo sekvenování nebo NGS

techniky (Jelkmann *et al.*, 2008). Existují také snahy pro získání protilátek, které by mohly být využity při sérologických testech typu ELISA, doposud se ale nepodařilo získat spolehlivé sérum (Matic *et al.*, 2009a).

Prvním popsaným izolátem, u kterého byla v roce 1997 také poprvé získána kompletní sekvence genomu LChV-1, je izolát UW2 (Karasev *et al.*, 1995; Keim-Konrad *et al.*, 1996, Jelkmann *et al.*, 1997) a od té doby se počet známých sekvencí izolátů stále zvyšuje. Pomocí Sangerova sekvenování nebo sekvenování nové generace („high throughput sequencing“, HTS) bylo získáno 14 úplných nebo téměř plných genomických sekvencí izolátů LChV-1 dostupných v databázi GenBank. Jako příklad sekvencí lze uvést izoláty ITMAR, UW2, V3356, Jerte, Ponferrada, Taian, YD, G15_3, Kyoto-2, C118-Iso1, -Iso13, -Iso15, P8-23, P8-42 (Candresse *et al.*, 2013; Jelkmann *et al.*, 1997; Katsiani *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2015; Matic *et al.*, 2009b; Ruiz-García *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Organizace genomů izolátů LChV-1 jsou si podobné a detailně byla popsána na původním izolátu UW2 (schéma viz obrázek 4). Genom dosahuje velikosti 17 kb (16 934 nt) a je organizován do osmi otevřeným čtecích rámců (ORFs). První otevřený čtecí rámec (ORF1a) kóduje 260 kDa polyprotein, který obsahuje konzervovanou doménu „papain-like“ proteázy, methyltransferázy a helikázy. „Papain-like“ proteáza se účastní replikace a je odpovědná za štěpení N-konce tvořícího se polyproteinu, methyltransferáza metyluje nukleotidy na 5'-konci a tvoří tím čepičku a helikáza plní funkci katalyzátoru v průběhu genové transkripce (Flores *et al.*, 2013; Mielech *et al.*, 2014; Ranji *et al.*, 2010). ORF1a je ukončen UGA stop kodonem v pozici 6 981. ORF1b kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp), která katalyzuje přepis původního vlákna RNA do vlákna nového (Ahlquist, 2002). Předpokládá se, že ORF1b je inicializován posunem +1 translačního rámce v stop kodonu ORF1a, podobně jako u *Beet yellows virus* (BYV) (Jelkmann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2016).

Druhý otevřený čtecí rámec (ORF2) má začátek 4 nukleotidy po stop kodonu UAA ORF1b a kóduje doménu pro malý hydrofobní protein o velikosti 4kDa (p4), který obsahuje N-terminální úsek nepolárních aminokyselin s předpokládanou transmembránovou doménou, u které se očekává role v intracelulárním pohybu (Jelkmann *et al.*; 1997, Wang *et al.*, 2016).



Obrázek 4: Schéma organizace genomu *Little cherry virus 1* (převzato a upraveno z Jelkmann *et al.*, 2012).

Legenda: ORF: otevřený čtecí rámeček, L-PRO: ‚papain-like‘ proteáza, MTR: methyltransferáza, HEL: helikáza, RdRp: RNA-dependentní RNA polymeráza, p4: hydrofobní protein o velikosti 4 kDa, HSP70: ‚heatshock‘ protein o velikosti 70 kDa, 61k: protein o velikosti 61 kDa, CP: plášťový protein, Cpm: plášťový protein minor, p21: protein o velikosti 21 kDa, p27: protein o velikosti 27 kDa

Prvních 11 nukleotidů třetího otevřeného čtecího rámce (ORF3), který kóduje homolog ‚heat-shock‘ proteinu o velikosti 70 kDa (HSP70h), je překryto ORF2 (Jelkmann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2016). Proteiny z rodiny HSP70 mají charakter molekulárního chaperonu a vyskytují se napříč všemi typy buněčných organismů (Boorstein *et al.*, 1994). Tyto proteiny se účastní různých procesů, např. regenerace buněk ze stresu, dohled na správnou konformaci vznikajících proteinů, rozložení oligomerních bílkovinných komplexů, import proteinů do endoplazmatického retikula nebo mitochondrií či transport receptorů (Morimoto *et al.*, 1994). Viry zpravidla gen pro HSP70 nekódují, čeledi *Closteroviridae* ale pravděpodobně tento gen získala pomocí rekombinace s hostitelskou mRNA (Dolja *et al.*, 1994). Následně bylo prokázáno, že HSP70h představuje odlišný typ virového ‚movement‘ proteinu a jeho hlavní funkcí u čeledi *Closteroviridae* je pohyb viru z buňky do buňky (Peremyslov *et al.*, 1999).

Čtvrtý otevřený čtecí rámeček (ORF4) kóduje polypeptid o velikosti 61 kDa (p61). Tento protein má chaperonový charakter, proto se uvažuje, že má společně s plášťovými proteiny a HSP70h důležitou funkci při sestavování virionu. Zároveň není vyloučené, že se společně s HSP70h účastní pohybu viru z buňky do buňky (Jelkmann *et al.*, 1997; Satyanarayana *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2016).

Plášťové proteiny (CP a Cpm) jsou kódovány pátým a šestým otevřeným čtecím rámcem (ORF5 a ORF6). Tyto proteiny kromě ochrany virového genomu mají i mnoho důležitých nestrukturálních funkcí, např. regulace replikace a translace genomu. Plášťový protein CP také interaguje s ‚movement‘ proteiny nebo jejich analogy a napomáhá tak k přenosu

virové částice z buňky do buňky. Bylo zjištěno, že CP může také fungovat jako supresor tlumící expresi genů hostitele (Ivanov *et al.* 2012; Jelkmann *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2004; Scholthof, 2005; Wang *et al.*, 2016).

Sedmý a osmý otevřený čtecí rámeček (ORF7 a ORF8) kódují dva polypeptidy s aktuálně neznámou funkcí o velikosti 21 kDa (p21) a 27 kDa (p27). O polypeptidu p21 se momentálně uvažuje jako o supresoru tlumícím expresi genů hostitele, ale je zapotřebí dalších studií (Jelkmann *et al.*, 1997; Katsiani *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016).

Sekvence izolátů *Little cherry virus 1* vykazují navzájem velkou variabilitu. U původních izolátů bylo prokázáno, že sekvence izolátů ITMAR a UW2 sdílejí 94% nukleotidovou identitu, zatímco německý izolát V2356 je odlišný. Izoláty se mohou lišit i délkou jednotlivých homologních proteinů. Relativně často je detekován kratší protein p4, a to u izolátů GR, No2_ISTO, PHLC28_5 a G18_2; pro izolát GR je charakteristický i kratší protein HSP70h. Naopak proteiny p21 a p27 jsou silně konzervovány a jsou typické pro LChV-1, v rámci ostatních zástupců rodu *Velarivirus* se podobné sekvence nevyskytují (Candresse *et al.*, 2013; Katsiani *et al.*, 2015).

Fylogenetické analýzy izolátů LChV-1 na základě oblastí genů pro RdRp, HSP70h, CP a CPM umožnily rozdělit izoláty do čtyř skupin. Dvě obsahovaly izoláty pocházející z třešní a druhé dvě izoláty infikující další zástupce rodu *Prunus*. Zároveň ale nebyla prokázána žádná korelace s geografickým původem izolátů či se samotným hostitelem. Příčinou detekovaných blízkých fylogenetických vztahů mezi izoláty původem z broskvoně, švestky, višně a třešně může být skutečnost, že se pro rod *Prunus* používá stejné podnoží při roubování. Analýza průměrného počtu nukleotidových záměn mezi sekvencemi na 1 nesynonymní (dN) a na 1 synonymní (dS) pozici (dN/dS poměr), ukázala nepřítomnost pozitivní selekce vůči genům *RdRp*, *HSP70h* a *CP*, a také naopak naznačila existenci silného selekčního tlaku, který zachovává jejich integritu a biologickou funkci. Gen pro RdRp vykazoval nejnižší poměr dN/dS, což vedlo k závěru, že tato oblast je pod silnou purifikační selekcí. Rekombinace u RNA virů byla dokumentována jako jedna z nevlivnějších pohonných sil ve tvorbě jejich variability. Rekombinace byla zaznamenávána již u izolátů jiných zástupců čeledi *Closteroviridae*, a proto je pravděpodobné že hrála důležitou roli i v evoluci a variabilitě LChV-1, i když byla konkrétně pozorována jen u řeckého izolátu No2_ISTO v oblasti 3'-konce genu *RdRp* (ORF1b) (Rubio *et al.*, 2013; Karasev *et al.*, 2000; Farooq *et al.*, 2013; Turturo *et al.*, 2005; Katsiani *et al.*, 2015; Matica *et al.*, 2009b).

U třešně obecné (*Prunus avium* (L.) L.) a višně obecné (*Prunus cerasus* L.) má LChV-1 infekce silný negativní dopad na výnos a kvalitu plodů. Vzhledem k tomu že mezi nové hostitele LChV-1 patří značná část oblíbených peckovin, je důležité dále rozšiřovat znalosti o jeho genetické variabilitě a epidemiologii, aby bylo možné efektivně zabraňovat šíření LChV-1 na další lokality a potencionální hostitele, u kterých se pravděpodobně prozatím vyskytuje pouze v latentní podobě a mohli by tak být významným virovým rezervoárem.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Bylo testováno 40 vzorků meruňky obecné (*Prunus armeniaca*), listy byly odebrány ve čtyřech lokalitách na jižní Moravě v roce 2018. Odebrané listy byly uchovány v chladicím boxu a poté dlouhodobě uloženy při -80 °C.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

100% etanol

Agarose SERVA for DNA electrophoresis (Serva, kat.č. 11404.05)

dNTP Mix (10 mM each) (Fermentas, kat.č. R0192)

GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, kat.č. 41002-0,5ml)

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat.č. SM0243)

Isopropanol (Lach-Ner, kat.č. 20037-AT0)

RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, kat.č. N211B)

Random Hexamer Primers (Bioline, kat.č. BIO-38028)

Použité soupravy

BioScript Reverse Transcriptase (Bioline, kat.č. BIO-27036)

MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline kat.č. BIO-21106)

Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., kat.č. 25800)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat.č. 28706)

Použité roztoky

0,1% bromfenolová modř v 30% glycerinu

50x TAE (242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml EDTA $c = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, doplněno na 1 l deionizovanou vodou)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)

Elektroforetická komora HU10 MINI (Fisherbrand)

Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hofer)

Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)

Minicentrifuga PRISMTM mini (Labnet International, Inc.)

Laminární box PV-100 (Telstar)

Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)

Transiluminátor G:BOX (SynGene) - dokumentační systém GeneSnap

Thermocycler T100TM Thermal Cycler (BIO-RED)

Thermocycler T personal (Biometra)

Váhy EK 200G (A&D Engineering)

Vortex MS1 Minishaker (IKA)

Výrobník ledu F100 Compact (Icematic)

Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing Block MB-102 (Bioer)

Zdroj stejnosměrného proudu MS major science, MP-250V (BioTech)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována ze vzorků listů pomocí kitu Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.) metodou adsorpce na silikátovou membránu.

Do homogenizační zkumavky bylo vloženo ≤ 50 mg listu a přidáno 600 μl lyzačního pufru C. Vzorek byl homogenizován pomocí homogenizační kuličky typu Matrix A a homogenizátoru při intenzitě $5,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 45 s. Následně byl homogenát krátce stočen na centrifuze a inkubován při $55 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 min. V průběhu inkubace byl homogenát míchán překlápěním. Lyzát byl přepipetován do filtrační kolony umístěné v čisté sběrné zkumavce a centrifugován 2 min při 14 000 rpm. Supernatant byl přemístěn do RNase-free zkumavky a bylo přidáno stejné množství 96–100% etanolu. Směs byla promíchána opatrným překlápěním, přepipetována do Spin kolony a centrifugována 1 min při 14 000 rpm. Supernatant byl odstraněn. Na kolonu bylo napipetováno 400 μl promývacího roztoku A, dále byla kolona centrifugována 1 min při 14 000 rpm a supernatant byl poté odstraněn. Tento krok byl dvakrát opakován. Následně byla kolona stočena další 2 min při 14 000 rpm. Sběrná zkumavka byla vyhozena do odpadu a spin kolona byla umístěna do čisté 1,7 ml eluční zkumavky. Na kolonu bylo napipetováno 50 μl elučního roztoku A a směs byla centrifugována 2 min při 2 000 rpm a následně 2 min při 14 000 rpm. Pro získání většího výtěžku RNA byla již eluovaná RNA v elučním roztoku A přepipetována opět na kolonu a znovu zcentrifugována za stejných podmínek.

Zkumavky s izolovanou RNA byly krátkodobě uchovávány na ledu a následně řádně popsány a uloženy do mrazicího boxu ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$). Koncentrace a kvalita vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometricky.

4.4.2 Reverzní transkripce

Přepis izolované RNA do komplementární DNA (cDNA) byl proveden reverzní transkripcí s pomocí kitu BioScript Reverse Transcriptase (Bioline) s použitím random primerů.

Vzorky RNA i všechny chemikálie byly po celou dobu práce v laminárním boxu uchovávány na ledu. Byly namíchany dvě reakční směsi. První směs obsahovala dEPC vodu, směs nukleotidů (dNTP) a random primery, druhá směs se skládala z dEPC vody, RT-PCR pufru, RNasin inhibitoru ribonukleáz a BioScript reverzní transkriptázy. Složení reakčních směsí je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci pro 1 test.

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace roztoku	Objem chemikálie [μl]
Reakční směs 1			
voda			5
dNTP	10 mmol·l ⁻¹	500 μmol·l ⁻¹	1
random primery	50 ng·μl ⁻¹	1 μmol·l ⁻¹	1
Reakční směs 2			
voda			4
Bioscript pufr	5x	1x	4
inhibitor ribonukleáz	40 U·μl ⁻¹	40 U	1
BioScript reverzní transkriptáza	200 U·μl ⁻¹	200 U	1

Reakční směs 1, která byla připravena pro více vzorků, byla rozpipetována po 7 μl do 0,2 ml mikrozkušavek a k tomu byly připipetovány 3 μl vzorku RNA o průměrné koncentraci 80 ng·μl⁻¹. Směs byla inkubována 5 min při 70 °C a následně okamžitě přenesena na led. Ke směsi bylo přidáno 10 μl reakční směsi 2, směs byla promíchána a byla provedena reverzní transkripce za podmínek doporučených výrobcem. Vzorky byly inkubovány 10 min při 25 °C, 30 min při 42 °C a 5 min při 85 °C. Získaná cDNA byla uchovávána při -18 °C.

4.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci *Little cherry virus 1* byly využity specifické primery 1LC_12776F a 1LC_13223R (Glasa *et al.*, 2015), LCV_1U_16390 a LCV_1L_16809 (Rott *et al.*, 2001). Virus šarky švestky (PPV) byl detekován pomocí specifických primerů PPV1 a PPV2 (Wetzel *et al.*, 1992). Jako templát byla použita cDNA získaná reverzní transkripcí z izolované celkové RNA. Sekvence primerů a velikost specifického produktu jsou uvedeny v tabulce 2.

Reakční směs pro PCR reakci se skládala z pufru, sterilní vody, primerů a MyTaqTM DNA polymerázy, její složení je uvedeno v tabulce 3. Reakční směs byla připravena pro více vzorků ve sterilním laminárním boxu na ledu a následně rozpipetována do 0,2 ml mikrozkušavek po 23 μl a byly přidány 2 μl vzorku cDNA. Zkušavky byly vloženy do thermo cycleru, kde byly inkubovány dle daného programu, viz tabulka 4. Získané PCR produkty byly uchovány při -18 °C.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
1LC_12776F	TCAAGAAAAGTTCTGGTGTGC	448	Glasa <i>et al.</i> (2015)
1LC_13223R	CGAGCTAGACGTATCAGTATC		
LCV_1U_16390	TCCGCCTGAAGCACCTAATCCA	420	Rott <i>et Jelkmann</i> (2001)
LCV_1L_16809	GGTAAGCGGTATAAAAACCCCTCCTCT		
PPV1	CCCTCACATCACCAGAGCCA	243	Wetzel <i>et al.</i> (1992)
PPV2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA		

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR reakci pro 1 test.

Reagencie	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace roztoku	Objem chemikálie [μl]
pufř	5x	1x	5,00
voda			17,55
forward primer	20 pmol·μl ⁻¹	0,1 μmol·l ⁻¹	0,13
reverse primer	20 pmol·μl ⁻¹	0,1 μmol·l ⁻¹	0,13
MyTaq TM DNA polymeráza	5 U·μl ⁻¹	1 U	0,20

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
primery 1LC_12776F/1LC_13223R (Glasa <i>et al.</i> , 2015)			
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	30 s	
hybridizace	52	30 s	40
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	5 min	1
primery LCV-1U_16390/LCV_1L_16809 (Rott <i>et Jelkmann</i> , 2001)			
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	30 s	
hybridizace	55	30 s	40
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	5 min	1
primery PPV1/PPV2 (Wetzel <i>et al.</i> , 1992)			
počáteční denaturace	94	3 min	1
denaturace	94	30 s	
hybridizace	62	30 s	40
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	5 min	1

4.4.4 Elektroforetická separace

Produkty PCR amplifikace byly detekovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu. Zásobní roztok 1% agarózového gelu byl připraven navážením 3 g agarózy a jeho rozpuštěním v 300 ml 1x TAE pufru. Zásobní roztok byl rozeřán v mikrovlnné troubě a buď použit okamžitě, nebo uchován v lednici při 4 °C. K mírně vychladlému agarózovému gelu o objemu 50 ml byly přidány 3 µl barviva GelRed. Směs byla důkladně promíchána a přelita do vaničky s hřebínkem v elektroforetické komůrce. Po ztuhnutí gelu byl gel převrstven 1x TAE puftrem a do jamek bylo napipetováno 5 µl reakční směsi. Pro určení velikosti PCR produktu bylo do první jamky dáno 1,5 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp DNA. Elektroforetická separace probíhala při 80 V přibližně 30–45 min. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí UV-transluminátoru a dokumentačního zařízení Syngene, G:Box.

4.4.5 Izolace PCR produktu z gelu

Izolace PCR produktu z gelu byla uskutečněna pomocí kitu QIAquick® Gel Extraction Kit dle přiloženého laboratorního protokolu.

Byl připraven 1% agarózový gel s přísadkou ethidium bromidu, gel o objemu 75 ml byl smíchán s 5 µl 1% ethidium bromidu a nalit do vaničky s hřebínkem v elektroforetické komůrce. Po zatuhnutí gelu byl gel převrstven 1x TAE puftrem. Do první jamky byly napipetovány 2 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp DNA a do dalších jamek byly dány vzorky smíchané s 5 µl 0,1% bromfenolové modři. Elektroforetická separace probíhala při 80 V přibližně 30–45 min.

Gel byl přenesen na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu a jednotlivé PCR produkty byly vyřezány sterilním skalpelem a umístěny do předpřipravených 1,5 ml zkumavek. Bylo pracováno v rukavicích a na každý vzorek byl použit nový skalpel, aby se co nejvíce zabránilo případné kontaminaci vzorků. Váha gelu byla zjištěna zvážením zkumavky s gelem a odečtením váhy samotné zkumavky a byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3 : 1. Zkumavky byly inkubovány 10 min při 50 °C pomocí termobloku až do úplného rozpuštění gelu. Zkumavky byly v průběhu inkubace

několikrát jemně protřepány. Byl přidán izopropanol v poměru 1 : 1, tj. 100 µg gelu a 100 µl izopropanolu. Byla sestavena kolona pro izolaci DNA, která se skládala z fialové kolony a sběrné zkumavky. Směs byla napipetována do kolony a zcentrifugována 1 min při 13 000 rpm. To, co proteklo, bylo vylito do odpadu. Do kolony bylo přidáno 500 µl QG pufru a vzorek byl opět zcentrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl opět odstraněn. Dále bylo do kolony napipetováno 750 µl PE pufru a vzorek byl zcentrifugován 1 min při 13 000 rpm. Supernatant byl vylit do odpadu. Centrifugace byla opakována za stejných podmínek. Sběrná zkumavka byla odstraněna a kolona byla umístěna do nové čisté 1,5 ml zkumavky. Do kolony bylo napipetováno 50 µl deionizované vody a zkumavka byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm.

Koncentrace a kvalita izolované DNA byla zkontrolována pomocí fluorimetru. Izolovaná DNA byla následně uchovávána při -70 °C.

4.4.6 Sekvenování a bioinformatická analýza

Sekvenační značení bylo provedeno pracovníky laboratoře pomocí kitu Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit, připravené vzorky byly analyzovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB AV ČR, CR-Haná, Olomouc.

Výstupní sekvence ze sekvenátoru byly poskládány do kontigů za použití programu SeqMan Lasergene (Dnastar, Inc.) a následně identifikovány pomocí programu BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, 1997). Poté byly sekvence studovaných izolátů společně s již známými sekvencemi LChV-1 dostupnými v databázi GenBank seřazeny v mnohočetný alignment prostřednictvím programu ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Výsledný mnohočetný alignment byl použit při fylogenetické analýze za použití algoritmu Neighbor-Joining a Tamura 3 parametrického modelu (Felsenstein, 1985; Saitou *et Nei*, 1987; Tamura, 1992). Získaný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí programu TreeExplorer. Mnohočetná přiřazení a veškeré fylogenetické analýzy a vizualizace byly provedeny v programu MEGA v. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

5 Výsledky

V rámci experimentální části bakalářské práce bylo analyzováno 40 vzorků meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) odebraných v květnu a červenci roku 2018 na čtyřech lokalitách na jižní Moravě. Seznam vzorků je uvedený v tabulce 5. Sesbírané listy pocházely ze stromů rostoucích ve starších produkčních sadech, byly většinou bezpříznakové, ale na některých listech bylo možné sledovat prosvětlování žilek a slabé chlorotické mozaiky (například obrázek 5).



Obrázek 5: Příklad listů meruňky obecné (*Prunus armeniaca* L.) vybraných pro následné analýzy (foto: LMBM, KBB PřF).

Z listů byla izolována celková RNA, která byla pomocí RT-PCR přepsána do komplementární DNA (cDNA), která byla použita jako templát pro PCR reakci se specifickými primery na detekci *Little cherry virus 1* (LChV-1). Vzorky byly také otestovány na přítomnost viru šarky švestky (*Plum pox virus*, PPV).

Tabulka 5: Seznam testovaných vzorků.

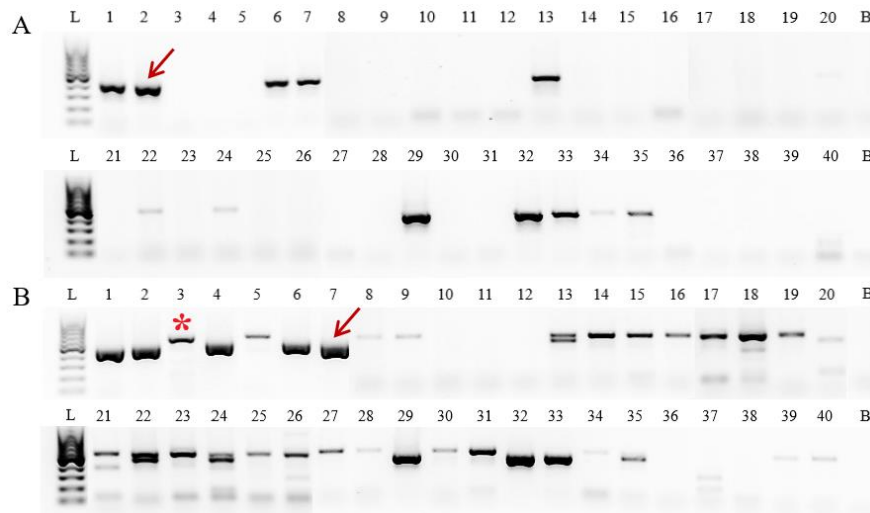
Datum sběru	Označení vzorku	Lokalita
23. 5. 2018	159-2018	A
	160-2018	
	162-2018	
	163-2018	
	164-2018	
	165-2018	
	166-2018	
	167-2018	
	170-2018	
	171-2018	
	173-2018	
	174-2018	
	175-2018	
	176-2018	
2. 7. 2018	166R-2018	B
	167R-2018	
	168R-2018	
	169R-2018	
	170R-2018	
	171R-2018	
	172R-2018	
	173R-2018	
	174R-2018	
	175R-2018	
	176R-2018	
	177R-2018	
	178R-2018	C
	179R-2018	
	180R-2018	
	181R-2018	
	182R-2018	
	183R-2018	
	184R-2018	
185R-2018		
186R-2018		
187R-2018		
188R-2018	D	
189R-2018		
190R-2018		
191R-2018		

5.1 Detekce LChV-1 a PPV

Little cherry virus 1 byl detekován pomocí PCR s použitím dvou kombinací primerů a to podle Rott *et al.* (2001) a Glasa *et al.* (2015). Při použití primerů LCV_1U_16390/LCV_1L_16809 byly detekovány pouze produkty o velikosti cca 420 bp, které odpovídají očekávané velikosti. V lokalitě A bylo zaznamenáno 5 pozitivních vzorků ze 14, v lokalitě B 2 vzorky z 12, v lokalitě C 5 vzorků z 10 a v poslední lokalitě D nebyl pozitivní ani jeden vzorek (obrázek 6). Celková frekvence LChV-1 ve vzorcích s touto kombinací primerů byla 30 %.

Pomocí druhé kombinace primerů 1LC_12776F/1LC_13223R byly získány dva produkty o velikostech cca 450 bp a 600 bp. Produkt o přibližné velikosti 600 bp se vyskytoval v 62,5 % vzorků a z toho u pěti vzorků byl zaznamenán dvojband. S cílem identifikovat větší produkt (v obrázku 6 označen hvězdičkou) byl produkt ze vzorku 176-2018 izolován a následně sekvenován. Bylo prokázáno, že získaná sekvence (o délce 452 bp) vykazuje 97,98 % identitu s chloroplastovou DNA (Acc. No. XM_008229959.1). Po vyloučení nespecifických produktů bylo v lokalitě A detekováno 6 pozitivních vzorků ze 14, v lokalitě B 4 vzorky z 12, v lokalitě C 4 vzorky z 10 a v lokalitě D opět nebyl zaznamenán žádný pozitivní vzorek (obrázek 6). *Little cherry virus 1* (LChV-1) byl s touto kombinací primerů detekován v 35 % případů.

Ve většině vzorků byl virus detekován pomocí obou kombinací detekčních primerů, ale u vzorku 186R-2018 byl produkt detekován pouze kombinací primerů LCV_1U_16390/LCV_1L_16809; druhou kombinací primerů 1LC_12776F/1LC_13223R byl LChV-1 navíc detekován ve vzorcích 163-2018, 170R-2018 a 173R-2018. Celková frekvence výskytu LChV-1 ve vzorcích byla 37,5 %. Na lokalitě D (šlechtitelské porosty) nebyl LChV-1 zaznamenán ani jednou kombinací detekčních primerů.



Obrázek 6: Detekce *Little cherry virus 1* (A) s primery dle Rotta *et al.* (2001) a (B) s primery dle Glasy *et al.* (2015).

Legenda: L: standard molekulární hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder), B: slepý vzorek, 1–40: vzorky, 1: 160-2018, 2: 165-2018, 3: 159-2018, 4: 163-2018, 5: 166-2018, 6: 167-2018, 7: 174-2018, 8: 162-2018, 9: 164-2018, 10: 170-2018, 11: 171-2018. 12:175-2018, 13: 176-2018, 14–39: 166R-2018 až 191R-2018, 40: 173-2018, *: nespecifický produkt, šipka: specifický produkt

Vzorky byly dále testovány na výskyt *Plum pox virus* (PPV) pro vyvrácení spojitosti možných symptomů pozorovaných na listech s onemocněním šarky švestky. Všechny vzorky byly negativní, nebyl získán specifický produkt potvrzující přítomnost PPV (příklad detekce viz obrázek 7).



Obrázek 7: Příklad detekce *Plum pox virus* (PPV).

Legenda: L: standard molekulární hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder), 1–15: vzorky, 1: 160-2018, 2: 165-2018, 3: 159-2018, 4: 163-2018, 5: 166-2018, 6: 167-2018, 7: 174-2018, 8: 162-2018, 9: 164-2018, 10: 170-2018, 11: 171-2018. 12:175-2018, 13: 176-2018, 14: 166R-2018, 15: 167R-2018

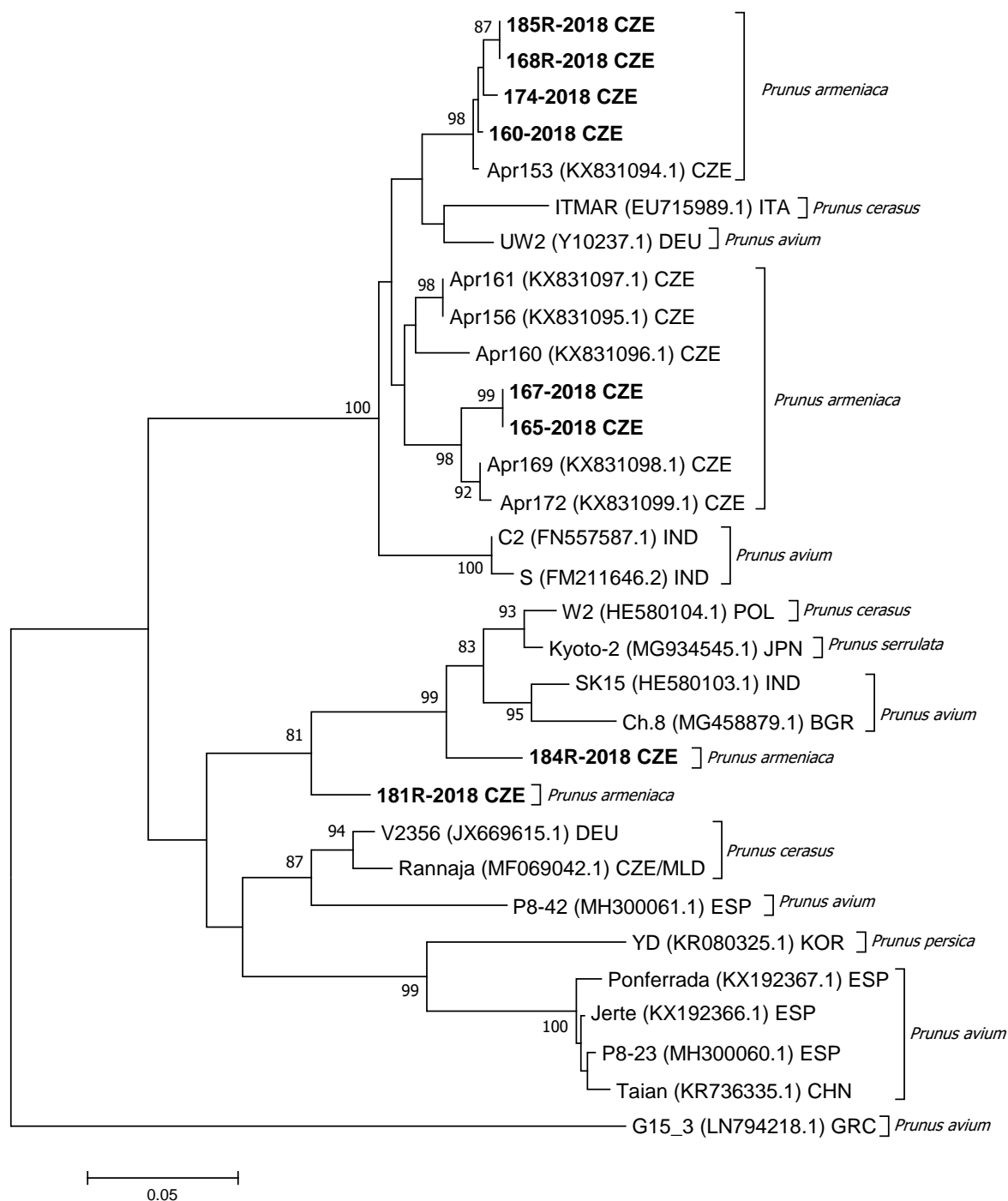
5.2 Fylogenetická analýza

Sangerovým sekvenováním byly pomocí kombinace primerů LCV_1U_16390/LCV_1L_16809 získány parciální sekvence ORF8 o velikosti 400–423 bp u osmi vzorků: 160-2018, 165-2018, 167-2018, 174-2018, 168R-2018, 181R-2018, 184R-2018 a 185R-2018 a pomocí kombinace primerů 1LC_12776F/1LC_13223R byly získány parciální sekvence plášťového proteinu o velikosti 420 bp a 452 bp u vzorků 174-2018 a 176-2018. Identita fragmentů ORF8 a plášťového proteinu byla ověřena prostřednictvím programu BLASTN a všechny fragmenty byly identifikovány jako sekvence *Little cherry virus 1* (LChV-1). Parciální sekvence ORF8 izolátů 160-2018, 174-2018, 168R-2018, 185R-2018 vykazovaly 98,77–99,51% identitu se sekvencí izolátu Apr153 z České republiky (Acc. No. KX831094.1). Sekvence izolátů 165-2018 a 167-2018 vykazovaly 97,27% a 97,15% identitu také s meruňkovým izolátem z České republiky, Apr172 (KX831099.1). Sekvence izolátů 181R-2018 a 184R-2018 byly nejvíce podobné, 86,99% a 93,63% identita, izolátu W2 z Polska (HE580104.1).

Parciální sekvence plášťového proteinu izolátu 174-2018 byla nejvíce podobná, 95,18% identita, s italským izolátem ITMAR (EU715989.1). Naopak izolát 176-2018 vykazoval 92,04% identitu s japonským izolátem Kyoto-2 (MG934545.1).

Při porovnání získaných meruňkových LChV-1 izolátů a izolátů dostupných v databázi GenBank bylo pomocí neighbor-joining fylogenetické analýzy parciálních sekvencí ORF8 zjištěno, že se izoláty rozdělily do 4 základních větví a české meruňkové izoláty se vyvětvily do dvou z nich (obrázek 8). Izoláty nacházející se v první větvi vykazovaly příbuznost s izolátem ITMAR, UW2 a indickými izoláty C2 a S. Dva izoláty se vyvětvily do druhé hlavní větve, kde vytvořily statisticky průkaznou skupinu společně s izoláty Kyoto-2, W2, SK15 a Ch.8.

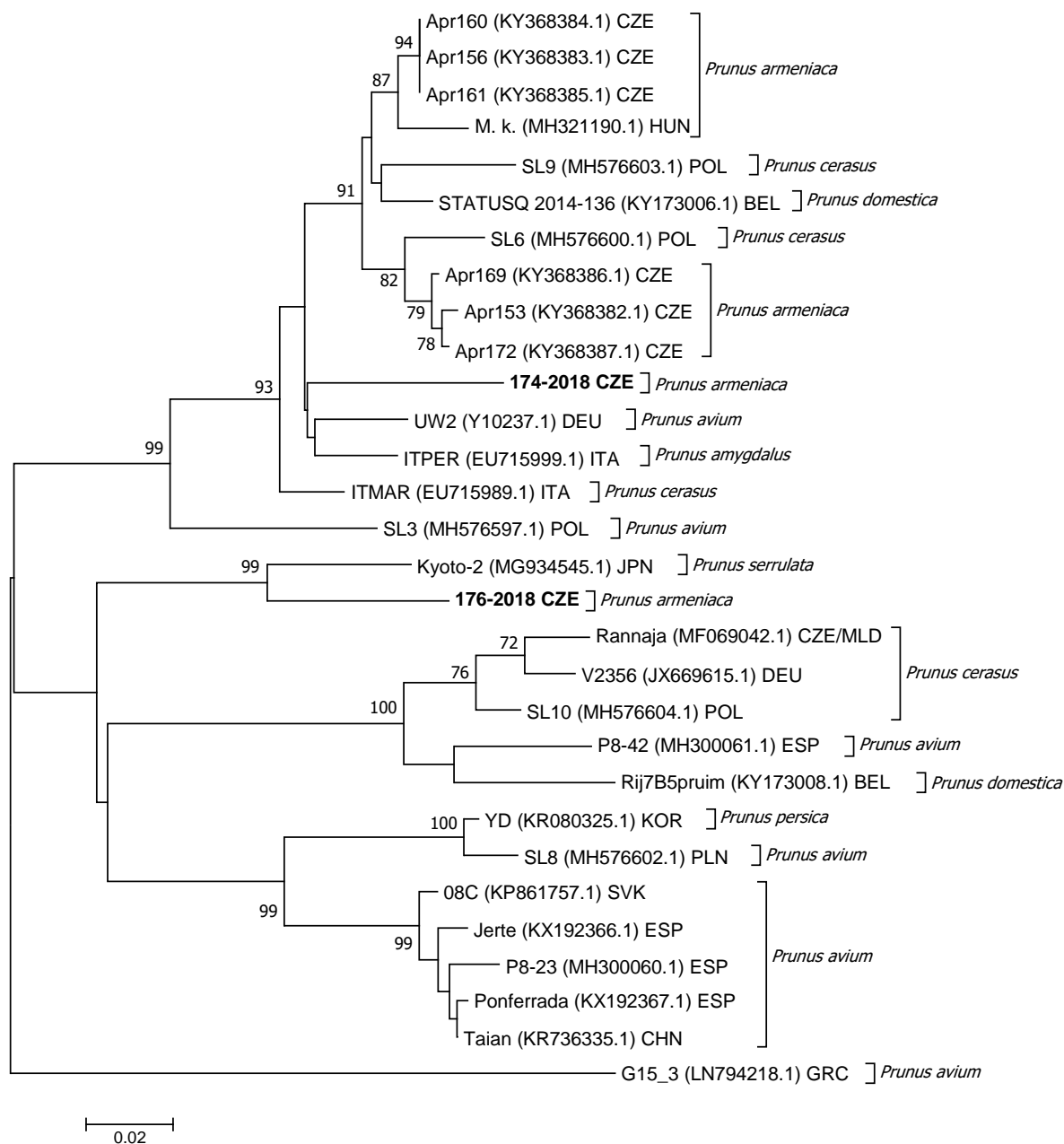
Při fylogenetické analýze parciálních sekvencí plášťového proteinu se strom rozdělil do pěti hlavních větví, kde se získané izoláty vyvětvily do dvou z nich (obrázek 9). Izolát 174-2018 vykazoval příbuznost s německým izolátem UW2 původem z třešně a italským izolátem ITPER získaným z mandloně. Dále se ve větvi vyskytoval společně s maďarským meruňkovým izolátem infikujícím meruňku cv. Magyar Kajszi (MH321190.1) a českými meruňkovými izoláty. Izolát 176-2018 společně s izolátem Kyoto-2 vytvořily samostatnou statisticky průkaznou větev.



Obrázek 8: Fylogenetický strom izolátů LChV-1 sestavený na základě parciálních nukleotidových sekvencí ORF8.

Měřítka představuje 0,05 substitucí na pozici. Bootstrap hodnoty menší než 70 nebyly zobrazeny.

Legenda: CZE: Česká republika, ITA: Itálie, DEU: Německo, IND: Indie, POL: Polsko, JPN: Japonsko, BGR: Bulharsko, MLD: Moldávie, ESP: Španělsko, KOR: Jižní Korea, CHN: Čína, GRC: Řecko



Obrázek 9: Fylogenetický strom izolátů LChV-1 sestavený na základě parciálních nukleotidových sekvencí plášťového proteinu.

Měřítko představuje 0,02 substitucí na pozici. Bootstrap hodnoty menší než 70 nebyly zobrazeny.

Legenda: CZE: Česká republika, HUN: Maďarsko, POL: Polsko, BEL: Belgie, DEU: Německo, ITA: Itálie, JPN: Japonsko, MLD: Moldávie, ESP: Španělsko, KOR: Jižní Korea, SVK: Slovensko, CHN: Čína, GRC: Řecko, M. k.: Magyar Kajszi

6 Diskuze

Little cherry virus 1 (LChV-1) je závažný patogen způsobující společně s *Little cherry virus 2* (LChV-2) a Western X disease fytoplazmou chorobu zvanou ‚Little cherry disease‘. Mezi její typické symptomy se řadí deformace a snížení kvality plodů, zbarvení listů do červena či zakrnělost růstu. Přírodními hostiteli LChV-1 je třešeň obecná (*Prunus avium* (L.) L.) a višně obecná (*Prunus cerasus* L.), ale v poslední době byl tento virus detekován na dalších zástupcích rodu *Prunus*. Jelikož se zástupci rodu *Prunus* řadí mezi významné a oblíbené peckoviny, je LChV-1 zařazen na seznam karanténních patogenů doporučených k regulaci (CABI, 2019; EPPO, 2019; Ludvíková *et* Suchá, 2011; WSU Tree Fruit, 2019).

V České republice byla choroba ‚Little cherry disease‘ poprvé detekována na třešních a višních ve východních Čechách v roce 2011 (Ludvíková *et* Suchá, 2011). V roce 2017 byl výskyt LChV-1 celosvětově poprvé detekován na meruňce obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.) v genových zdrojích v České republice, což vedlo k dalšímu rozšíření znalosti o okruhu hostitelů tohoto viru (Šafářová *et al.*, 2017). Na základě tohoto zjištění byl v rámci experimentální části bakalářské práce zjišťován výskyt LChV-1 a studována genetická variabilita izolátů u souboru 40 vzorků meruňky obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.) původem ze 4 lokalit z jižní Moravy.

Na listech testovaných rostlin bylo pozorováno občasné prosvětlování žilek a slabé chlorotické mozaiky, ale většina listů byla bezpříznaková. V rámci experimentu bylo prokázáno, že pozorované prosvětlování žilek nemá spojitost s infekcí *Plum pox virus* (PPV), ale není možné vyvrátit spojitost s jiným patogenem. Virus byl detekován u 14 stromů, u kterých nebyly pozorovány žádné specifické příznaky, případně jen fyziologické žloutnutí listů. Tato zjištění potvrzují domněnku o latentní infekci. Infekce LChV-1 vyvolává intenzivní příznaky a významné poškození plodů u třešně obecné (*Prunus avium* (L.) L.) a višně obecné (*Prunus cerasus* L.) (CABI, 2019; Matic *et al.*, 2009b; Ludvíková *et* Suchá, 2011) a sakury ozdobné (*Prunus serrulata* Lindl.) (Candresse *et al.*, 2012; Kunze *et al.*, 1982; Matic *et al.*, 2009b). V případě nových hostitelů LChV-1 detekovaných v posledních letech, broskvoní, meruňek a švestek, byla doposud zaznamenána také jen latentní infekce (Marais *et al.*, 2016; Matic *et al.*, 2007; Šafářová *et al.*, 2017; Tahzima *et al.*, 2016).

S kombinací primerů 1LC_12776F/1LC_13223R byl detekován nespecifický produkt o přibližné velikosti 600 bp. První část vzorků byla odebrána na konci května 2018 a frekvence nespecifického produktu byla 42,86 %, ale u vzorků sesbíraných na začátku července 2018 byla již četnost výskytu 73,08 %. Výskyt nespecifického produktu se tedy zvyšuje v závislosti s časem sběru vzorků. Čím v pozdějším létě byly vzorky odebrány, tím častěji byl detekován vznik nespecifických produktů. Autoři těchto primerů, kteří je využili k detekci LChV-1 infikující třešň obecnou (*Prunus avium* (L.) L.), neuvedli žádný výskyt nespecifických produktů. Není proto jasné jestli tento nespecifický produkt vzniká pouze u meruňky obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.) nebo je ho možné zaznamenat u vzorků získaných ze starších listů všech hostitelských zástupců rodu *Prunus*.

U čtyř vzorků (163-2018, 170R-2018, 173R-2018, 186R-2018) byl LChV-1 detekován pouze jednou ze dvou zvolených kombinací primerů. Při použití pouze jedné kombinace detekčních primerů by tedy mohlo dojít k falešně negativním výsledkům. K podobným poznatkům dospěli již dříve Katsiani *et al.* (2018), kteří s ohledem na neshody v cílových místech detekčních primerů doporučují pro zvýšení jejich LChV-1 detekčního rozsahu používat více kombinací detekčních primerů zacílených na oblasti HSP70 a CP.

Druhá část experimentální části bakalářské práce se zabývala genetickou analýzou získaných parciálních sekvencí deseti izolátů meruňky obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.). Doposud známé sekvence izolátů LChV-1 jsou velmi variabilní (Katsiani *et al.*, 2015; 2018), což se ukázalo i u českých meruňkových izolátů, které se rozdělily do dvou samostatných větví v rámci fylogenetického stromu založeného jak na parciálních sekvencích ORF8, tak i fylogenetického stromu založeného na parciálních sekvencích plášťového proteinu.

Při studování variability izolátů LChV-1, infikujících nového hostitele, fylogenetickou analýzou nebyla potvrzena geografická ani hostitelská specifita detekovaných izolátů, což je v souladu se zjištěním Katsiani *et al.* (2015). Ve fylogenetických stromech nedošlo k vytvoření samostatných klastrů podle země původu izolátů nebo původu hostitele. Přestože většina meruňkových izolátů vykazovala příbuznost s izoláty původem z Evropy, byl mezi studovanými LChV-1 izoláty identifikován i meruňkový izolát 176-2018, který by průkazně nejpříbuznější s izolátem Kyoto-2 (MG934545.1) pocházejícím z Japonska ze sakury ozdobné (*Prunus serrulata* Lindl.).

U *Little cherry virus 1* (LChV-1) doposud není znám přirozený vektor, ale víme, že je přenosný vegetativně pomocí roubování a může se tedy rozšiřovat pomocí šlechtitelského materiálu (Katsiani *et al.*, 2015). Je tedy pravděpodobné, že se LChV-1 rozšířil do komerčních sadů právě prostřednictvím infikovaných podnoží, a takto došlo k infekci meruněk izolátem vykazující příbuznost s asijskými izoláty LChV-1. Nelze ale plně vyloučit vliv neznámého vektoru.

Detekce LChV-1 na meruňce obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.) poukazuje na nutnost dalšího výzkumu a prohlubování znalostí ohledně epidemiologie, hlavně překvapující absence vektoru, a genetické variability LChV-1. Je důležité zamezit rozšiřování tohoto viru na další potencionální hostitele, u kterých může vyvolat závažné infekce.

7 Závěr

Experimentální část bakalářské práce se zabývala detekcí *Little cherry virus 1* (LChV-1) v souboru náhodně sesbíraných 40 vzorků meruňky obecné (*Prunus armeniaca* (L.) L.), rostoucích ve starších komerčních výsadbách, pocházejících ze čtyř lokalit na jižní Moravě. Virus byl detekován pomocí dvojí kombinace detekčních primerů a celková frekvence LChV-1 ve vzorcích byla 37,5 %, virus byl prokázán na třech ze čtyř lokalit.

Byly získány parciální nukleotidové sekvence otevřeného čtecího rámce 8 (ORF8) a parciální nukleotidové sekvence plášťového proteinu (CP). Identita fragmentů byla ověřena pomocí programu BLASTN a všechny byly identifikovány jako sekvence LChV-1. Většina získaných izolátů byla nejvíce podobná dříve popsáním českým meruňkovým izolátům Apr153 (Acc. No. KX831094.1) a Apr172 (KX831099.1), ale některé vykazovaly příbuznost i s polským izolátem W2 (HE580104.1), italským izolátem ITMAR (EU715989.1) a japonským izolátem Kyoto-2 (MG934545.1). Fylogenetická analýza nepotvrdila žádnou hostitelskou či geografickou specifitu izolátů.

Na základě získaných výsledků je patrné, že je potřeba neustále rozšiřovat znalosti o genetické variabilitě, hostitelích a o možnostech přenosu LChV-1 na další hostitele rodu *Prunus*. Dále je nutné, aby začalo docházet k pravidelným kontrolám šlechtitelského materiálu, aby mohlo být efektivně zabráněno v jeho dalším rozšiřování na potenciální hostitele.

8 Literatura

- Agranovsky A. A., Lesemann D. E., Maiss E., Hull R., Atabekov J. G. (1995): „Rattlesnake“ structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2470–2473.
- Ahlquist P. (2002): RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296: 1270–1273.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402
- Al Rwahnih M., Dolja V. V., Daubert S., Koonin E. V., Rowhani A. (2012): Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus Research* 163: 302–309.
- Barath D., Jaksa-Czotter N., Molnar J., Varga T., Balassy J., Szabo L. K., Kirilla Z., Tusnady G. E., Preininger E., Varallyay E. (2018): Small RNA NGS revealed the presence of Cherry virus A and Little cherry virus 1 on apricots in Hungary. *Viruses-Basel* 10.
- Bar-Joseph M. (2014): *Closteroviridae*: the beginning. *Frontiers in Microbiology* 5: 14.
- Bar-Joseph M., Mawassi M. (2013): The defective RNAs of *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology* 4: 132.
- Bar-Joseph M., Yang G., Gafny R., Mawassi M. (1997): Subgenomic RNAs: The possible building blocks for modular recombination of *Closteroviridae* genomes. *Seminars in Virology* 8: 113–119.
- Benada J., Špaček J., Baudyš E. (eds.) *et al.* (1962): *Zemědělská fytopatologie díl IV. Choroby ovocných rostlin. Československá akademie zemědělských věd. Praha.*
- Biju G., Binu G., Mayur A., Ram Nageena S. (2016): In silico genome-wide identification and analysis of microsatellite repeats in the largest RNA virus family (*Closteroviridae*). *Turkish Journal of Biology* 40: 589-599.

- Boorstein W. R., Ziegelhoffer T., Craig E. A. (1994): Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 38: 1–17.
- Buchtová I. (2018): Situační a výhledová zpráva ovoce. Ministerstvo zemědělství. Praha.
- Candresse T., Marais A., Faure C., Gentit P. (2013): Association of *Little cherry virus 1* (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology* 103: 293–8.
- Diekmann M., Putter C. A. J. (1996): Stone fruits. FAO, IPGRI in collaboration with Instituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Řím.
- Dolja V. V., Karasev A. V., Koonin E. V. (1994): Molecular biology and evolution of Closteroviruses: Sophisticated build-up of large RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology* 32: 261–285.
- Dvořák A. (ed.) *et al.* (1978): Atlas odrůd ovoce. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- Farooq A. B., Ma Y. X., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G. P., Hong N. (2013): Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in *Grapevine leafroll-associated virus 3* in China. *Virus Research* 171: 15–21.
- Febres V. J., Ashoulin L., Mawassi M., Frank A., Bar-Joseph M., Manjunath K. L., Lee R. F., Niblett C. L. (1996): The p27 protein is present at one end of Citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331–1335.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fiore N., Fernandez C., Quiroga N., Pino A. M., Rivera L., Sagredo K., Zamorano A. (2018): First report of *Little cherry virus 1* in Chile. *Plant Disease* 102: 689–690.
- Flores R., Moreno P., Falk B., Martelli G. P., Dawson W. O. (2013): e-Book on *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology* 4: 411.
- Glasa M., Benediková D., Predajňa L. (2015): First report of Little cherry virus-1 in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 97: 541–551.
- Hladík F., Malík T., Jirásek F., Šobek J., Nitka J. (1966): Malá pomologie IV. Meruňky, broskve, mandle, ořechy vlašské a lískové. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.

- Hluchý M., Ackermann P., Zacharda M., Bagar M., Jetmarová E., Vanek G. (1997): *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné. Ochrana ovocných dřevin a révy vinné v integrované produkci.* Biocont Laboratory s. r. o. Brno.
- Hričovský I., Benediková D., Krška B. (2004): *Meruňky a broskvoně. Příroda.* Bratislava.
- Cho S. Y., Kim H., Yi S. I. (2018): First report of *Little cherry virus 1* and *2* in sweet cherry in Korea. *Plant Disease* 102: 1045–1046.
- Isogai M., Aoyagi J., Nakagawa M., Kubodera Y., Satoh K., Katoh T., Inamori M., Yamashita K., Yoshikawa N. (2004): Molecular detection of five cherry viruses from sweet cherry trees in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 70: 288–291.
- Ivanov K. I., Mäkinen K. (2012): Coat proteins, host factors and plant viral replication. *Current Opinion in Virology* 2: 712–718.
- Jan T. (2011): *Peckoviny. Baštan.* Olomouc.
- Jarugula S., Gowda S., Dawson W. O., Naidu R. A. (2010): 3'-Coterminal subgenomic RNAs and putative *cis*-acting elements of *Grapevine leafroll-associated virus 3* reveals 'unique' features of gene expression strategy in the genus *Ampelovirus*. *Virology Journal* 7: 180.
- Jelkmann W., Fechtner B., Agranovsky A. A. (1997): Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology* 78: 2067–2071.
- Jelkmann W., Hergenbahn F., Berwarth C. (2010): Transmission of *Little cherry virus -1* (LChV-1) by *Cuscuta europea* to herbaceous host plants. *Mitteilungen - Julius Kühn Institut* 427: 272–274.
- Jelkmann W., Leible S., Rott M. (2008): Little cherry closteroviruses -1 and -2, their genetic variability and detection by Real-Time-PCR. *Acta Horticulturae* 781: 321–329.
- Jelkmann W., Mikona C., Turturo C., Navarro B., Rott M. E., Menzel W., Saldarelli P., Minafra A., Martelli G. P. (2012): Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7. *Archives of Virology* 157: 359–362.
- Karasev A. V. (2000): Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293–324.

- Karasev A. V., Boyko V. P., Gowda S., Nikolaeva O. V., Hilf M. E., Koonin E. V., Niblett C. L., Cline K., Gumpf D. J., Lee R. F., Garnsey S. M., Lewandowski D. J., Dawson W. O. (1995): Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511–520.
- Katsiani A. T., Maliogka V. I., Amoutzias G. D., Efthimiou K. E., Katis N. I. (2015): Insights into the genetic diversity and evolution of *Little cherry virus 1*. *Plant Pathology* 64: 817-824.
- Katsiani A. T., Maliogka V. I., Katis N., Svanella-Dumas L., Olmos A., Ruiz-García A. B., Marais A., Faure Ch., Theil S., Lotos L., Candresse T. (2018): High-throughput sequencing reveals further diversity of *Little cherry virus 1* with implications for diagnostics. *Viruses-Basel* 10: 385.
- Keim-Konrad R., Jelkmann W. (1996): Genome analysis of the 3'-terminal part of the Little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Archives of Virology* 141: 1437–1451.
- King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (2011): *Virus Taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo.
- Komorowska B., Cieslinska M. (2004): First report of *Cherry virus A* and *Little cherry virus-1* in Poland. *Plant Disease* 88: 909.
- Králiková K. (1956): Problematika vírusových chorob ovocných drevín v Bulharsku. *Polnohospodárstvo III* 6: 815–823.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874.
- Kunze L. (1982): Experiments with Shirofugen stunt virus, a latent virus of sour cherry. *Acta Horticulturae* 130: 53–58.
- Lim S., Igor, D., Yoo R. H., Zhao F., Cho I. S., Choi G. S., Lim H. S., Lee S. H., Moon J. S. (2015): Genomic detection and characterization of a Korean isolate of *Little cherry virus 1* sampled from a peach tree. *Virus Genes* 51: 260–266.

- Loebenstein G., Lecoq H. (2012): Advances in virus researchs. Viruses and virus diseases of vegetables in the Mediterranean basin. Volume 84. Academic Press. San Diego.
- 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 of the United States of America* 101: 15742–15747.
- Ludvíková H., Suchá J. (2011): First report of Little cherry disease from sweet cherry (*Prunus avium*) and sour cherry (*P. cerasus*) in the Czech Republic. *Disease Notes* 95: 1197.
- Marais A., Faure C., Theil S., Svanella-Dumas L., Brans Y., Maurice I., Blin V., Candresse T. (2016): First report of *Little cherry virus 1* on plum in France. *Plant Disease* 100: 2544–2545.
- Martelli G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Agranovsky A. A. , Al Rwahnih M., Dolja V. V., Dovas C. I., Fuchs M., Gugerli P., Hu J. S., Jelkmann W. (2012): Taxonomic revision of the family *Closteroviridae* with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 94: 7-19.
- Martelli G. P., Agranovsky A. A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R. H. A., Dolja V. V., Falk B. W., Gonsalves D., Jelkmann W. (2002): The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147: 2039-2044.
- Matic S., Minafra A., Boscia D. da Cunha A. T. P., Martelli G. P. (2009a): Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods* 155: 72–76.
- Matic S., Minafra A., Sanchez-Navarro J. A., Pallas V., Myrta A., Martelli G. P. (2009b): ‚Kwanzan Stunting‘ syndrome: detection and molecular characterization of an Italian isolate of little cherry virus 1. *Virus Research* 143:61–67.
- Matic S., Myrta A., Minafra A. (2007): First report of Little cherry virus-1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology* 89: S75.
- Mielech A. M., Chen Y., Mesecar A. D., Baker S. C. (2014): Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Research* 194: 184–190.

- Mikona C., Jelkmann W., (2010): Replication of *Grapevine leafroll-associated virus -7* (GLRaV-7) by *Cuscuta* species and its transmission to herbaceous plants. *Plant Disease* 94: 471–476.
- Morimoto R. I., Tissières A., Georgopoulos C. (1994): The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Muñoz Baena L., Gutiérrez Sánchez P. A., Marín Montoya M. (2016): Genome sequencing of *Potato yellow vein virus* (PYVV) strain infecting *Solanum lycopersicum* in Colombia. *Acta biológica Colombiana* 22: 5–17.
- Navrátil M., Fialová R. *et al.* (2008): Fytoplazmy. Významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci. Kostelec na Hané.
- Ogawa J. M., English H. (1991): Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Oakland.
- Pappu S. S., Febres V. J., Pappu H. R., Lee R. F., Niblett C. L. (1997): Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Research* 47: 51–57.
- Peremyslov V. V., Hagiwara Y., Dolja V. V. (1999): HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14771–14776.
- Raine J., Weintraub M., Schroeder B. (1975): Flexuous rods and vesicles in leaf and petiole phloem of little-cherry diseased *Prunus* spp. *Phytopathology* 65: 1181–1186.
- Raine J., Weintraub M., Schroeder, B. (1979): Hexagonal tubules in phloem cells of little cherry infected trees. *Journal of Ultrastructural Research* 67: 109–116.
- Ranji A., Boris-Lawrie K. (2010): RNA helicases. Emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA Biology* 7: 775–787.
- Rod J. (2008): Atlas chorob a škůdců ovoce, zeleniny a okrasných rostlin. Víkend. Most.
- Rott M. E., Jelkmann W. (2001): Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with Little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology* 91: 261–267.

- Rubio L., Guerri J., Moreno P. (2013): Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Frontiers in Microbiology* 4: 151.
- Ruiz-Garcia A. B., Martinez C., Santiago R., Garcia M. T., de Prado N., Olmos A. (2016): First report of *Little cherry virus 1* (LChV-1) in sweet cherry in Spain. *Plant Disease* 100: 2340.
- Saitou N. et Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Satyanarayana T., Gowda S., Mawassi M., Albiach-Martí M. R., Ayllón M. A., Robertson C., Garnsey S. M., Dawson W. O. (2000): Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278: 253–265.
- Schlesingerová G. (2011): Virus šarky švestky: Plum pox virus. Ministerstvo zemědělství České republiky, Státní rostlinolékařská správa. Praha.
- Scholthof H. B. (2005): Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in Plant Science* 10: 376–382.
- Šafářová D., Faure C., Candresse T., Navrátil N., Nečas T., Marais A. (2017): First report of *Little cherry virus 1* infecting apricot in the Czech Republic. *Plant Disease* 101: 845.
- Tahzima R., Foucart Y., Peusens G., Belien T., Massart S., De Jonghe K. (2017): First report of *Little cherry virus 1* affecting european plum (*Prunus domestica*) in Belgium. *Plant Disease* 101: 1557–1557.
- Tamura K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678–687.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–80.

- Turturo C., Saldarelli P., Yafeng D. *et al.* (2005): Genetic variability and population structure of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates. *Journal of General Virology* 86: 217–224.
- Verma L. R., Sharma R. C. (1999): *Disease of Horticultural Crops: Fruits*. Elegant Printers. New Dehli.
- Vitushkina M., Fechtner B., Agranovsky A., Jelkmann W. (1997): Development of an RT-PCR for the detection of Little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *Eur. J. Plant Pathology* 103: 803–808.
- Wang J., Zhu D., Tan Y., Zong X., Wei H., Hammond R. W., Liu Q. (2016): Complete nucleotide sequence of little cherry virus 1 (LChV-1) infecting sweet cherry in China. *Archives of Virology* 161: 749–753.
- Welsh M. F., Cheney P. W. (1976): Little cherry. In: Gilmer R. M., Moore J. D., Nyland G., Welsh M. F., Pine T. S. (ed.): *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*, pp. 231–237, United States Department of Agriculture, Washington D. C.
- Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J. (1992): A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39: 27–37.

Internetové zdroje

CABI. Invasive Species Compendium. Little cherry virus. [online] [navštíveno 5. 2. 2019]

Dostupné z <https://www.cabi.org/ISC/>

Encyclopedia of Life. [online] [navštíveno 6. 10. 2018]

Dostupné z <http://eol.org>

EPPO Global Database. *Little cherry virus 1*. [online] [navštíveno 5. 2. 2019]

Dostupné z <https://gd.eppo.int/>

Integrated Taxonomic Information System. [online] [navštíveno 8. 10. 2018]

Dostupné z <https://www.itis.gov/>

International Committee on Taxonomy of Viruses. [online] [navštíveno 8. 10. 2018]

Dostupné z <https://talk.ictvonline.org/>

Ovocnářská unie České republiky. [online] [navštíveno 25. 1. 2019]

Dostupné z <http://www.ovocnarska-unie.cz/>

The Plant List. [online] [navštíveno 6. 10. 2018]

Dostupné z <http://www.theplantlist.org/>

ViralZone. [online] [navštíveno 28. 1. 2019]

Dostupné z <https://viralzone.expasy.org/>

Washington State University Tree Fruit. [online] [navštíveno dne 6. 2. 2019]

Dostupné z: <http://treefruit.wsu.edu/>