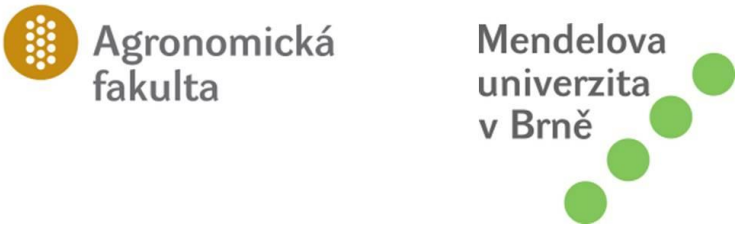
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017 **KATEŘINA PROKEŠOVÁ**

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství



Molekulární metody vhodné pro identifikaci rostlinných patogenů

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
doc. Ing. Ivana Šafránková, Ph.D.

Vypracovala:
Kateřina Prokešová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Molekulární metody vhodné pro identifikaci patogena vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:……..

……

podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Ludmile Holkové Ph.D. za odborné vedení, pomoc při práci v laboratoři a všechny cenné rady, které mi dala. Dále děkuji doc. Ing. Ivaně Šafránkové Ph.D. za odborné rady. V poslední řadě děkuji mé rodině za psychickou podporu a optimismus.

Abstrakt

Tato práce obsahuje literární rešerši týkající se přehledu molekulárních metod a imunochemických metod a jejich srovnání. Další kapitola je o rostlinných virech na pšenici. Cílem experimentální části bylo detekovat WDV v porostu pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) v primární fázi přirozené infekce pomocí metody PCR a u infikovaných rostlin vyhodnotit symptomy. Závěrem porovnat nukleotidové sekvence tohoto viru dostupné v GenBank z hlediska jejich podobnosti v oblasti námi použitých primerů.

Abstract

This thesis contains a literary research on the overview of molecular methods and immunochemical methods and their comparison. The next chapter is about wheat germs. The aim of the experimental part was to detect WDV in winter wheat *(Triticum aestivum)* in the primary phase of natural infection using the PCR method and evaluate the symptoms in infected plants. Finally, compare the nucleotide sequences of this virus available in GenBank in terms of their similarity in the area of the primers used by us.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 CÍL PRÁCE 8
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 8
3.1 Choroby pšenice ozimé 8
3.2 Virózy pšenice ozimé 9
3.2.1 Virová žlutá zakrslost pšenice (*Barley Yellow Dwarf Virus*-BYDV) 10
3.2.2 Virová zakrslost pšenice (*Wheat Dwarf Virus*-WDV) 11
3.2.2.1 Metodika detekce viru zakrslosti pšenice 13
3.3 Diagnostika patogenů 13
3.4 Imunochemické metody 14
3.4.1 Metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 14
3.4.2 Immunostrip test 15
3.4.3 Luminex – xMap 15
3.5 Metody molekulární detekce 16
3.5.1 Extrakce a purifikace nukleových kyselin patogena 16
3.5.2 Měření DNA/RNA spektrofotometricky 17
3.5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction) 17
3.5.3.1 Složení reakční směsi 17
3.5.3.2 Průběh PCR reakce 18
3.5.4 Vizualizace produktů PCR pomocí elektroforézy 18
3.5.4.1 Elektroforéza 18
3.5.4.2 Kapilární elektroforéza 18
3.5.4.3 Gelová elektroforéza 19
3.5.4.4 Vizualizace elektroforézy 19
3.5.5 Hybridizace se specifickou sondou 19

3.5.6 Modifikace PCR 20
3.5.6.1 Multiplex PCR 20
3.5.6.2 Real Time PCR (qPCR) 20
3.5.6.3 RT PCR (reverse transcription PCR) 21
3.5.6.4 IC PCR (Immunocapture PCR) 21
3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism) - RFLP 22
3.7 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism) - AFLP 22
3.8 Srovnání molekulárních metod s ELISA metodou, mikrospickými metodami 22
3.9 Využití molekulárních metod 22
4 MATERIÁL A METODIKA 23
4.1 Charakteristika stanoviště 23
4.2 Charakteristika použitých odrůd 23
4.3 Charakteristika pokusu 23
4.4 Izolace DNA z rostlinného materiálu 24
4.5 PCR detekce 25
4.6 Hodnocení vzorků s využitím elektroforézy 26
4.7 Hodnocení symptomů v porostu 26
5 VÝSLEDKY A DISKUZE 27
5.1 Hodnocení symptomů 30
5.2 Porovnání nukleových sekvencí WDV v GenBank z hlediska jejich podobnosti v oblasti námi použitých primerů 31
6 ZÁVĚR 33
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 34
8 SEZNAM ZKRATEK 41
9 SEZNAM PŘÍLOH 42

1 ÚVOD

Díky rychlému vývoji poznatků v oblasti genetiky a molekulární biologie se zdokonalují současné a vyvíjejí nové molekulární metody. Postupně se starší rutinní mikroskopické metody sloužící k identifikaci patogenů začínají nahrazovat novějšími molekulárními metodami. Důvodem může být i to, že molekulární metody jsou objektivnější, dokáží přesněji detekovat velké množství vzorků za relativně krátký čas. V současné době se molekulární metody využívají hlavně k rutinní detekci virů z důvodu přesnějšího zařazení virů do kmenů.

U virů může docházet k mutacím, a proto i z tohoto důvodu je důležitá přesná identifikace. V současné době se virové patogeny šíří čím dál více. Může v tom hrát velkou roli měnící se klima, např. teplé podzimy. Tento fakt nahrává i živočišným přenašečům rostlinných virů, kdy velký počet jedinců přežívá v příznivých klimatických podmínkách. V neposlední řadě hraje významnou roli i agrotechnika, zúžené sledy plodin s vysokým zastoupením monokultur nebo stejných druhů plodin.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je:

- vypracovat literární rešerši týkající se přehledu molekulárních metod vhodných pro detekci rostlinných patogenů
- detekovat *Wheat Dwarf Virus* v porostu pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) v primární fázi přirozené infekce pomocí metody PCR
- u infikovaných rostlin vyhodnotit symptomy
- porovnat nukleotidové sekvence tohoto viru dostupné v GenBank z hlediska jejich podobnosti v oblasti námi použitých primerů

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Choroby pšenice ozimé

V České Republice je pšenice ozimá nejrozšířenější obilninou zastoupenou v osevních sledech. V současné době se celková výměra ploch osetých pšenicí ozimou pohybuje kolem 900 tis. ha. Zdravotní stav porostu, a následně výnos, ovlivňují nejen agronomické a enviromentální faktory, ale i četné patogeny a škůdci (PROKINOVÁ *et al.*, 2009, KŮDELA *et al*., 2012). K nejvýznamnějším patří původci listových chorob.

Mezi původce listových chorob na pšenici ozimé patří:

- *Pyrenophora tritici-repentis* původce pyrenoforové skvrnitosti pšenice
- *Mycosphaerella graminicola* původce septoriové skvrnitosti pšenice
- *Puccinia graminis* f.sp *tritici* původce černé rzivosti trav
- *Puccinia recondita* původce hnědé rzivosti pšenice
- *Cochliobolus sativus* původce hnědočerné skvrnitosti pšenice
- *Blumeria graminis* původce padlí pšenice
- *Monographella nivalis* původce sněžné plísňovitosti obilnin
- *Phaeosphaeria nodorum* původce feosferiové skvrnitosti pšenice

- *Typhula idahoensis* původce tyfulové plísňovitosti obilnin
- *Puccinia dtriiformis* původce žluté rzivosti pšenice

Mezi původce stonkových chorob patří:

- *Ceratobasidium cornigerum* původce lemované stébelné skvrnitosti pšenice
- *Oculimacula yallundae* původce stéblolamu pšenice

Mezi původce kořenových chorob patří:

- *Gauemannomyces graminis var. graminis* původce černání kořenů a báze stébel obilnin
- *Cochliobulus sativus* původce obecné krčkové a kořenové hniloby pšenice
- *Thanatephorus cucumeris* původce rizoktoniové hniloby pšenice

Mezi původce napadající klasy a zrno patří:

- *Mycosphaerella tassiana, Cladosporium spp., Stemphylium spp*. původci černě obilnin
- *Tilletia caries* původce mazlavé snětivosti pšenice
- *Claviceps purpurea* původce námelovitosti trav
- *Ustilago tritici* původce prašné snětivosti pšenice
- *Aspergillus spp., Penicillium spp.* původci skládkové plísňovitosti obilek pšenice
- *Gibberella zeae* původce růžovění klasů pšenice
- *Tilletia controversa* původce zakrslé snětivosti pšenice

3.2 Virózy pšenice ozimé

Mezi virové choroby obilnin patří virová zakrslost pšenice (*Wheat dwarf virus* - WDV), virová žlutá zakrslost pšenice (*Barley yellow dwarf virus* - BYDV), virová čárkovitá mozaika pšenice (*Wheat streak mosaic virus* - WSMV), virová mozaika pšenice (*Brome mosaic virus* - BMV), virová pruhovitá mozaika pšenice (*European wheat striate mosaic virus* - EWSMV) a virová žlutá zakrnělost obilnin (*Cereal yellow dwarf virus* - CYDV). Tyto viry napadají většinu obilnin na celém světě. Proto je důležité regulovat tyto viry a zároveň jejich přenašeče. Ve velké míře se BYDV a WDV viry mohou vyskytovat zároveň. (JAROŠOVÁ *et al*., 2016, KŮDELA *et al.,* 2012)

3.2.1 Virová žlutá zakrslost pšenice (Barley Yellow Dwarf Virus - BYDV)

Původcem virózy je virus žluté zakrslosti ječmene (*Barley Yellow Dwarf Virus* - BYDV). Způsobující onemocněni obilnin na celém světě. Virus napadá většinu druhů obilnin, zejména pšenici ozimou *(Triticum aestivum L.),* ječmen *(Hordeum vulgare),* kukuřici *(Zea mays),* ale i oves *(Avena sativa)* a žito *(Secale cereale).* (JAROŠOVÁ *et al.,* 2009)

BYDV patří do rodu *Luteovirus* a v současné době se rozlišují dvě podskupiny. Do rodu *Luteovirus* patří BYDV-PAV, BYDV-PAS, BYDV-MAV a BYDV-GAV (BARTOŠ *et al.,* 2002). Dalším rodem je *Polerovirus* a sem patří CYDV-RPV (MILLER a RASOCHOVÁ, 1997, CORREA *et al.,* 2005). Zbylé druhy BYDV-RMV, BYDV-SGV, BYDV-GPV nebyly zařazeny (JAROŠOVÁ *et al.,* 2009).

Symptomy napadení pšenice ozimé virem BYDV jsou většinou žlutě zbarvené listy a zakrslý růst. Žloutnutí listů od špičky a okrajů. Může se i objevit deformace listů. V pokročilejším stadiu může dojít i k redukci kořenů a ke snížení výnosu zrna (DARCY, 1995, MILLER a RASOCHOVÁ, 1997).

BYDV je přenášen perzistentně mšicemi, dodnes je známo přes 25 druhů žijících na čeledi *Poaceae* přenášejících viry. To znamená, že se virus nepřenáší na potomstvo (RASTGOU *et al.,* 2005).

K primární infekci virem BYDV dochází na podzim, sekundární infekce se může vyskytnout na jaře až létě. Nejnebezpečnější je primární infekce na podzim způsobená migrací mšic z výdrolu obilnin (TEULON *et al.,* 1999, JAROŠOVÁ *et al.,* 2009).

BYDV má i velký dopad na produkci obilí ve světě. Průměrné ztráty ve světě způsobené přirozenou infekcí virem BYDV se pohybují kolem 80 % (MILLER a RASOCHOVÁ, 1997, KEITH *et al.,* 2000), a výskyt BYDV neustále stoupá (PROKINOVÁ *et al.,* 2009, KOKLU, 2005). Díky genetickému zkoumání bylo identifikováno několik genů rezistence proti viru BYDV a začaly být translokovány do odrůd pšenice (AYALA *et al.,* 2002).

Diagnostika BYDV probíhá nejčastěji metodou ELISA (KEITH *et al.,* 2000). Dále je možná symptomatická polní diagnostika nebo lze pomocí One step RT-PCR (KUNDU *et al.,* 2009).

3.2.2 Virová zakrslost pšenice (Wheat Dwarf Virus-WDV)

Původcem virózy je virus zakrslosti pšenice (*Wheat Dwarf Virus* – WDV). V České Republice, především v nižších polohách Čech a Moravy v ozimých obilninách, byl zaznamenán zvýšený výskyt na pšenici *(Triticum aestivum)*, ječmeni *(Hordeum vulgare)*, triticale *(Triticosecale)*, žitě *(Secale cereale)* a ovsu *(Avena sativa)*. V České Republice je nejvíce rozšířen kmen pšeničný (WDV-W) a kmen ječný (WDV-B). Dále existuje kmen ovesný (JAROŠOVÁ *et al.,* 2016). Pšeničný kmen má největší spektrum hostitelů, může napadnout i planě rostoucí a plevelné trávy, např. oves hluchý *(Avena fatua)*, jílek *(Lolium multiflorum)* nebo chundelku metlici *(Apera spica-venti)* (RIPL *et al.,* 2008).

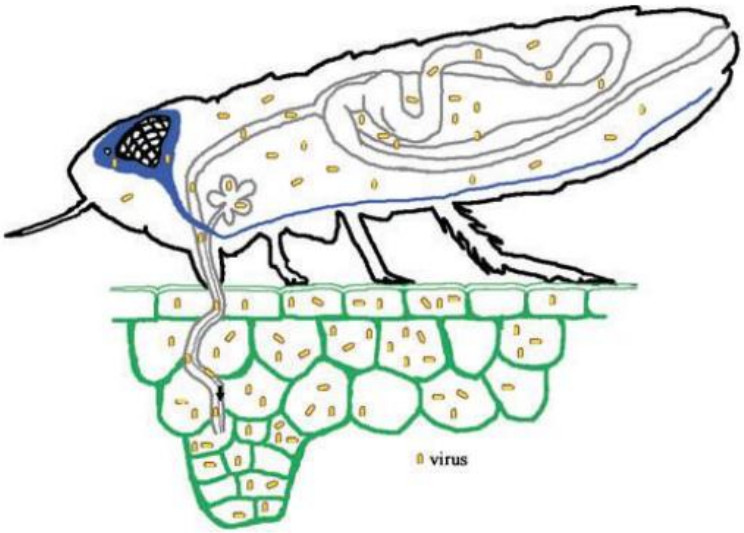
WDV patří do čeledi *Geminiviridae,* pro niž je charakteristická dvojitá kapsida, která obsahuje jednu cyklickou jednovláknovou molekulu DNA (HAYES *et al.,* 1988, SCHALK *et al.,* 1989, SCHUBERT *et al.,* 2007).

Charakteristickým příznakem u všech napadených druhů obilnin je zakrslost rostlin. Další symptomy se mohou lišit a nemusí se objevit u všech napadených obilnin (MANURUNG *et al.,* 2005). Časté je odumírání terminálního listu, deformace a prohýbání listů, žloutnutí starších listů, omezené sloupkování. První symptomy se mohou objevit již na podzim, ale zřetelnější se stávají až po přezimování (RIPL *et al.,* 2008).

Obr.č. 1 Příznaky silné infekce virem zakrslosti pšenice (Foto J. Vacke. VÚRV, Praha)

Jediný známý přenašeč viru zakrslosti pšenice je křísek polní *Psammotettix alienus* (Dahlbom, 1850). Křísek polní patří do řádu polokřídlí *Hemiptera* a do čeledi křískovití *Cicadellidae*. Vyskytuje se na polích a loukách, především na rostlinách z čeledi lipnicovitých. Většinou má 2-3 generace za rok (JAŇOUROVÁ *et al*., 2009, WANG *et al.,* 2014).

Virus se přenáší perzistentně, to znamená, že se nemůže množit v těle přenašeče. Není teda ani možný přenos přes potomstvo, mechanicky nebo osivem. Nejprve musí křísek vysát floémové šťávy s virem z napadené rostliny, které se mu dostanou až do slinných žláz. Při dalším sání se virové částice dostávají se slinami do rostliny. Takto je infikována zdravá rostlina. Křísek polní může virus uchovat v těle až 50 dní (MANURUNG *et al.,* 2005). Nejčastějšími přenašeči jsou okřídlení dospělci, kteří mohou přenést virus i na vzdálenější porosty. Ke konci léta se stěhují na výdroly obilnin a způsobují primární infekci porostu. Na jaře vylíhlé nymfy sají na napadených rostlinách a přenáší tak virus na další rostliny (sekundární rozšiřování infekce) (JAŇOUROVÁ *et al*., 2009).



Obr.č.2 Schéma přenosu viru křískem (Hogenhout et al., 2008)

3.2.2.1 Metodika detekce viru zakrslosti pšenice

Napadení rostlin virem WDV v polních podmínkách lze detekovat obtížně až po objevení symptomů. Navíc symptomy jsou jen těžko rozeznatelné od symptomů vyvolaných BYDV, případně jiných patogenů nebo poruch.

Pro rutinní laboratorní detekce se nejčastěji využívá metoda DAS ELISA, ale touto metodou nelze rozlišit jednotlivé kmeny viru (pšeničný/ječný) (VACKE a CIBULKA, 2002).

PCR reakce využívá syntézy virové DNA, která se pak zviditelní pomocí elektroforézy (BENKOVICS *et al*., 2010, ZHANG *et al.,* 2010). Pomocí specifického štěpení PCR produktů možné zachytit různé kmeny viru, které jsou odlišitelné na základě specifických mutací v cílovém místě endonukleázy (RIPL *et al.,* 2008). Kvantifikace viru v pletivu rostlin i tkáních přenašeče je možná pomocí qPCR s využitím fluorescenčního barviva SYBR green (JAROŠOVÁ *et al*., 2016). Také je možné PCR reakcí detekovat virus WDV ve vektoru (rozdrcený křísek polní) (WANG *et al.,* 2014).

3.3 Diagnostika patogenů

Diagnostika patogenů pomocí imunochemických a molekulárních metod se začala rozšiřovat z důvodu přesnější identifikace různých rodů, druhů a kmenů patogenů (viry, houby, bakterie), pro něž nebylo možné využít mikroskopické metody, či nebyly dostatečně přesné. Především u virů jsou známy různé mutace (např. kmeny s odlišnou patogenezí), které díky molekulárním metodám lze od sebe lépe rozlišit.

3.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na specifické a citlivé reakci antigen/protilátka (TARGOŠOVÁ a HRABOVSKÁ, 2016). Protilátky tvoří látky bílkovinné povahy. Antigeny jsou cizorodé částice nejčastěji proteiny, polysacharidy nebo nukleové kyseliny. V případě fytopatologie jsou za antigeny považovány patogeny (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005).

3.4.1 Metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA metoda se používá pro identifikaci přítomnosti jednotlivých virů v rostlinném materiálu. Je známo několik modifikací, nejčastější je DAS ELISA tzv. sendvičová technika. Metodu ELISA můžeme dále použít pro zjištění přítomnosti mykotoxinů v rostlině nebo v produktech, jako jsou semena nebo plody (GARCIA *et al.*, 1997). Nevýhodou metody ELISA je relativně dlouhá doba než se dá vyhodnotit a nepřesné určení patogena vlivem cross reakcí (WIRTZ *et al*., 1987).

ELISA metoda je založena na možnosti vyhodnotit vznik komplexu protilátka-antigen-enzymaticky značená protilátka. Celá reakce probíhá na mikrotitračních destičkách. Podmínky, látky a doba působení se mohou lišit podle výrobce daného diagnostického setu (CLARK a ADAMS, 1977, RYŠAVÝ *et al*., 2002).

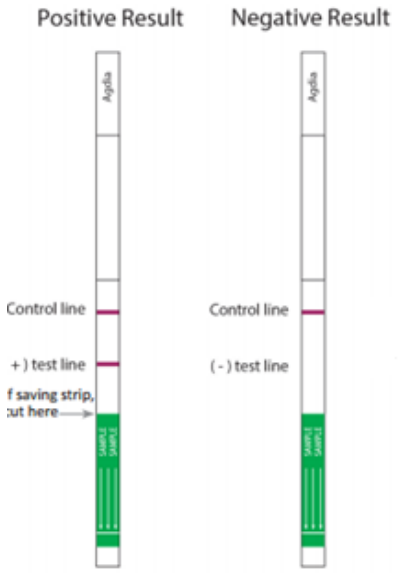
Ze zkoumaného vzorku se vyizoluje lyzát s extrakčním pufrem. Na jamky mikrotitrační destičky se nejprve naváže protilátka a nechá se inkubovat. Po promytí se přidá připravený lyzát a inkubuje se. Následně po promytí se přidá enzymaticky značená protilátka, inkubuje se a promyje, V posledním kroku se přidá substrát. Vyhodnocení se většinou provádí pomocí spektrofotometru při 405 nm (BARTUŠKOVÁ, 2007, TARGOŠOVÁ a HRABOVSKÁ, 2016).

Za pozitivní vzorek se považuje ten, u kterého dojde k pozitivní reakci alespoň ve dvou opakováních, zároveň musí být jeho absorbance minimálně dvojnásobná, než průměr absorbance kontroly. Bohužel má tato metoda i své nevýhody. Může dojít k falešně pozitivním výsledkům vlivem špatného promývání, nečistoty v jamce, nebo nežádoucí odpařování obsahu z krajových jamek během inkubací (RYŠAVÝ *et al*., 2002).

3.4.2 Immunostrip test

Immunostrip test se používá jako rychlý způsob pro zjištění přítomnosti patogena na plodinách přímo v porostu. Nevyžaduje žádné zařízení (SÁNCHEZ *et al*., 2005, HEALY *et al*., 2007).

Od výrobce jsou k dostání testovací pásky na zjištění konkrétního patogena. Na pásku se nachází zóna s protilátkou proti hostiteli a zóna proti patogenu. Do vyextrahované buněčné šťávy ze sledované rostliny se ponoří pásek a v případě pozitivního výsledku se objeví 2 pásky, v případě negativní kontroly pouze proužek v oblasti protilátek proti hostiteli viz obr.č. 3(Agdia Handbook).



Obr.č.3 Immunostrips pozitivní a negativní výsledek (Agdia)

3.4.3 Luminex – xMap

Tato metoda spočívá v navázání specifických protilátek v roztoku na speciální mikročástice (kuličky), které se od sebe liší velikostí a nesou odlišnou fluorescenční značku. Výhodou tedy je, že v jedné reakci může probíhat a být hodnoceno více různých imunoreakcí současně (DUNBAR, 2006). Částečně je možná i kvantifikace vzorků.

Flourescenčně kódované mikrokuličky jsou konjugované se specifickými protilátkami, které jsou vytvořeny pro cílového patogena. Vyhodnocení probíhá za pomoci speciálního přístroje (průtokový cytometr) (CHARLEMRO, 2013).

3.5 Metody molekulární detekce

Díky vývoji technik rekombinantní DNA a různých modifikací PCR se začala vyvíjet i analýza genů a genových produktů pro detekci a identifikaci patogenů. V dnešní době mohou vědci izolovat jakýkoliv gen z jakéhokoliv organismu. Většina molekulárních metod je založena na znalostech struktury DNA v oblasti nekódujících sekvencí, oblastech genů, transkriptů na úrovni RNA a konečných produktech - většinou proteinů (SNUSTAD, 2009).

3.5.1 Extrakce a purifikace nukleových kyselin patogena

Prvním krokem většiny molekulárních metod je extrakce DNA nebo RNA z rostlinných buněk a jejich oddělení od ostatních buněčných složek. Cílem těchto procesů je získat nukleovou kyselinu (DNA/RNA) v nativním stavu. Existuje mnoho různých metod purifikace nukleových kyselin. Důležitá je dostupnost vstupního materiálu, kterým mohou být například kultury bakteriálních nebo eukaryotických buněk, nebo vzorky tkání či pletiv, které musí být před lyzí buněk homogenizovány. Vstupní materiál může být čerstvý, zamražený nebo lyofilizovaný (WEISING *et al*., 2005, ALBERTS *et al*., 1998). Odstranění RNA z purifikované DNA lze dosáhnout působením ribonukleázy. Ribonukleáza je stabilní enzym i při vysoké teplotě a proto je možné jej zahřátím zbavit stop nežádoucích deoxyribonukleáz, které by DNA mohly poškodit (SYAMKUMAR *et al*., 2003).

Při purifikaci nukleových kyselin na chromatografických kolonkách, které jsou často vsazeny do centrifugačních mikrozkumavek a kombinují tak chromatografii s centrifugací se používají dva hlavní přístupy. Při gelové chromatografii se vzorek nanáší na kolonu, jejíž náplň je tvořena malými porézními zrnky nosiče. Malé molekuly prostupují do porézní matrice, zatímco velké molekuly nukleových kyselin matricí

neprostupují (CHMELÍK, 2005). Při afinitní chromatografii je zajištěna interakce mezi makromolekulami vzorku a náplní kolony. Jedná se o interakci elektrické povahy, založené na afinitě kladně nabitých chemických skupin nosiče k negativně nabitým zbytkům kyseliny fosforečné v molekule DNA. Využívá imobilizace nukleových kyselin na nosiči a odmytí nežádoucích molekul, které kolonou volně procházejí. Následně použitím jiného pufru se molekuly nukleových kyselin uvolní z nosiče (VAŘILOVÁ, 2005). Nukleové kyseliny izolované chromatograficky mají vysoký stupeň čistoty (ŠMARDA, 2005).

3.5.2 Měření DNA/RNA spektrofotometricky

Při syntéze genů je důležité znát množství DNA v připraveném vzorku. Koncentraci DNA lze přesně změřit pomocí ultrafialové (UV) absorpční spektrofotometrie. Množství UV záření absorbovaného roztokem DNA je přímo úměrné množství DNA ve vzorku. Tato metoda může také sloužit k ověření čistoty vzorku DNA. V čistém vzorku DNA je poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm 1,8. Jestliže je poměr nižší než 1,8, získaná DNA je kontaminovaná například proteiny. Pro RNA platí poměr absorbancí 260 nm a 280 nm 2,0 (CRAIG *et al*., 2014).

3.5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR patří v současné době mezi nejdůležitější nástroje molekulárních metod používaných v diagnostice patogenů. Tato metoda umožňuje syntézu milionů kopií specifické sekvencí DNA (20-35 cyklů) z malého množství matricové molekuly (EDWARDS *et al.,* 1991).

3.5.3.1 Složení reakční směsi

K reakci je potřeba mít k dispozici matricovou DNA, trifosfáty, 2 primery (krátké úseky jednovláknové DNA, které se vážou do oblastí DNA s komplementárními úseky bazí), Taq polymerázu, která vydrží i opakované vysoké teploty (HODEK *et al.,* 2008).

3.5.3.2 Průběh PCR reakce

V první fázi se DNA zahřívá na 95 °C, aby se oddělili řetězce DNA (denaturace). Následuje navázání primerů při tzv. teplotě „annealigu“ 40-65 °C. V dalším kroku se začne fungovat termostabilní DNA polymeráza (Taq polymeráza). Za přítomnosti dNTPs (deoxyribonukleosidtrifosfátů) následuje prodlužování řetězce při teplotě 72 °C. V rámci jednoho cyklu jsou syntetizovány vždy dvě kopie matricové DNA. Na to navazují další cykly (většinou 25 cyklů) a tímto způsobem se během několika hodin syntetizují miliony kopií sekvencí matricové DNA. Po skončení PCR se produkt analyzuje na gelu (MCCARTNEY *et al*., 2003, HODEK *et al.*, 2008).

3.5.4 Vizualizace produktů PCR pomocí elektroforézy

3.5.4.1 Elektroforéza

Molekuly nukleových kyselin migrují od záporného náboje ke kladnému náboji. Velikost náboje nukleových kyselin je dána molekulární hmotností molekul. Částice s větším nábojem se budou pohybovat rychleji než částice s malým elektrickým nábojem (CIBIČEK, 2014).

Elektroforéza probíhá na gelových nosičích, které jsou většinou komerčně dostupné. Gely jsou nejčastěji tvořené agarózou (horizontální elektroforéza) nebo polyakrylamidovým gelem (vertikální elektroforéza) (KŘÍŽEK *et al*., 2009).

3.5.4.2 Kapilární elektroforéza

Nejjednodušší elektromigrační technika založená na principu oddělování látek v homogenním prostředí elektrolytu. Oba konce křemenné kapiláry jsou ponořeny do naplněných elektrodových nádob. Separační prostor kapilár umožňuje odvod tepla, a tím využití elektrického pole pro vysokou účinnost separace (KŘÍŽEK *et al*., 2009). Složky vzorku, které se liší svou pohyblivostí, se začnou pohybovat různými rychlostmi, oddělují se od sebe a vytvářejí jednotlivé vrstvy. Tyto vrstvy vzorku lze sledovat pomocí

UV záření. Ze získaného časového průběhu absorpce (elektroforeogram), je možné získat informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita je dána časem píku a kvantita je přímo úměrná ploše píku (KAŠIČKA, 1997).

3.5.4.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza využívá pro rozlišení určitých úseků molekuly DNA-k jejich identifikaci a částečné kvantifikaci. Do jamek zpolymerizovaného gelu (agarózový, polyakrylamidový) se napipetuje dané množství nukleové kyseliny, zaleje pufrem a pustí se jednosměrný proud; přičemž nukleové kyseliny migrují vždy ve směru od záporného pólu ke kladnému pólu (VÍTÁMVÁS *et al*., 2010). Na agarózovém gelu je optimální velikost separovaných molekul 100–50 000 pb. Na akrylamidovém gelu je tato velikost nižší 10–1000 pb. Mezi vzorky je nutno zařadit negativní kontrolu. Vzorky se rozlišují podle elektroforetické mobility, která závisí na molekulové hmotnosti (DVOŘÁK, 2008).

3.5.4.4 Vizualizace elektroforézy

Jednotlivé produkty lze hodnotit pomocí interkalační barvičky (např. ethydiumbromid) obsažené v gelu (agarózový) nebo barvením gelu v interkalační barvičce (akrylamidový gel). Vizualizace je možná osvícením obarveného gelu na přístroji zvaném UV transiluminátor, který zviditelní fragmenty DNA (obvykle při vlnových délkách UV 302-365 nm) (HODEK *et al.,* 2008). Pro zviditelnění proteinů na akrylamidovém gelu se může také použít barvivo Brilliant Blue podle návodu výrobce nebo barvení stříbrem pro tmavé proužky (VÁŇA, 2004, VÍTÁMVÁS *et al*., 2010).

3.5.5 Hybridizace se specifickou sondou

Tato metoda umožňuje identifikaci a lokalizaci určité sekvence nukleotidů v DNA. Podle komplementarity se spojí vlákno DNA s označenou sondou. K hybridizaci dochází v různých nosičích (membrány) nebo přímo ve zkoumaném biologickém materiálu. Nejpoužívanější metodou je metoda FISH, při které se používají fluorescenčně značené sondy při tzv. in- situ hybridizaci (MOTER a GOBEL, 2000, HOBZA, 2003).

3.5.6 Modifikace PCR

V současné době se nepoužívá jen klasická PCR reakce, ale využívají se i různé modifikace PCR.

3.5.6.1 Multiplex PCR

Multiplex PCR je založena na vysoce citlivé detekci různých molekul DNA v průběhu jedné reakce. Díky této reakci je možné rozlišit příbuzné viry nebo bakterie. Tato metoda se často používá ve fytopatologii, protože většinou jednoho hostitele napadá více kmenů virů nebo bakterií (HENEGARIU *et al*., 1997).

Nejdůležitější částí pro tuto reakci je správné navrhnutí primerů, které musí hybridizovat za stejné teploty „annealigu“ a nesmí se vzájemně ovlivňovat. Výsledné produkty musí být od sebe odlišitelné např. fluorescenčně. Jednotlivé produkty mohou být následně rozštěpeny restrikční endonukleázou pro stanovení mutací. Výhodou této metody je úspora času a také úspora chemikálií (LOPEZ, 2003).

3.5.6.2 Real Time PCR (qPCR)

qPCR umožňuje vizualizaci a hodnocení nárůstu PCR produktu po každém cyklu reakce (hodnocení PCR v reálném čase).

Rozlišujeme dva typy qPCR. Relativní qPCR umožňuje porovnání množství patogenů v testovaných vzorcích v porovnání a s předem stanovenou kontrolou (vnitřní kontrola). Absolutní qPCR hodnotí počet kopií patogena na určité množství nukleové kyseliny hostitele. Počty kopií se počítají odečtem z kalibračních křivek, které jsou vytvořeny z izolátů čisté kultury patogena nebo z rekombinantních plazmidů obsahujících hodnocenou sekvenci patogena. Pro vyhodnocení se využívá fluorescentních barviv např. SYBR green (LEE *et al*., 2006). Pro tuto metodu jsou speciální cyclery s optickým modulem, které jsou vybaveny softwarem pro analýzu výsledků. Největší výhodou qPCR je rychlost reakce a možnost přesné kvantifikace (MCCARTNEY, 2003).

SYBR green je nejpoužívanější barvivo, je to fluorescenční substrát nespecifický, což znamená, že se naváže pouze na ds DNA bez ohledu na sekvenci. Pro qPCR je také možné použít fluorescenční sondy, které hybridizují se specifickou sekvencí v poloze mezi 2 primery (např. TaqMan sonda, Molecular beacons) nebo jsou součástí primeru (Scorpion sonda). Tyto sondy mohou být značeny různými barvami fluorochromu, což umožňuje hodnotit více patogenů v 1 reakci (POITRAS a HOUDE, 2002, LEE *et al*., 2006).

3.5.6.3 RT PCR (reverse transcription PCR)

Do PCR reakce může vstupovat jako matrice pouze molekula DNA. Při použití RNA (RNA viry) je nejdříve nutno za přítomnosti enzymu reverzní transkriptázy převést RNA na cDNA a poté už může proběhnout klasická PCR reakce s Taq polymerázou. Druhou možností je použití komerčních kitů pro tzv. One step RT PCR, při které probíhají obě enzymatické reakce v jednom kroku (v jedné mikrozkumavce), ale časově následně za sebou (liší se reakční teploty obou enzymů) (GIBSON, 2011).

One step RT PCR je výhodná z toho důvodu, že snížením počtu kroků při přípravě se snižuje možnost kontaminace a chyb. Další výhodou je rychlost reakce a úspora chemikálií. Nejprve proběhne reverzní transkripce, a následně se aktivuje Taq polymeráza, která se účastní vlastní PCR (denaturace, prodlužování řetězce a syntéza nových řetězců). Poté je možné vizualizovat výsledky na gelu nebo vyhodnotit v systému qPCR (JAROŠOVÁ a KUNDU, 2010, GIBSON, 2011).

3.5.6.4 IC PCR (Immunocapture PCR)

Metoda založená na kombinaci metody ELISA a PCR. Nejprve se provedou první dva kroky ELISA (v jamkách se naváže protilátka a následně buněčná šťáva s antigenem), v jamce může dále pokračovat RT PCR (PCR). U RNA virů musí jako první proběhnout reverzní transkripce (NOLASCO, 1993, PTÁČEK *et al.,* 2002, MALLIK *et al*., 2012).

3.6 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism) - RFLP

Tato metoda na hodnocení délkového polymorfismu úseků DNA, které jsou výsledkem štěpení DNA pomocí specifických restrikčních endonukleáz (restriktáz), které štěpí molekuly DNA v přesně dané sekvenci nukleotidů. Při elektroforéze hodnotíme počet a velikost fragmentů daný počtem cílových míst pro daný enzym v testované molekule DNA. Mutace může zrušit nebo může dát vzniknout novému cílovému místu (GARCIA, 2004).

3.7 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism) - AFLP

Tato metoda umožňuje analýzu polymorfismu v celkové sekvenci patogena bez znalosti sekvence DNA. Nejprve se DNA rozštěpí dvěma různými restriktázami, konce štěpených fragmentů se prodlouží pomocí syntetických polylinkerů a z těchto úseků DNA se pomocí 2 následných PCR vybere jen část fragmentů. Na elektroforéze se hodnotí rozdíly v počtu a velikostech fragmentů, přičemž jsou sledovány úseky o určité délce (URLICH *et al*., 1999).

3.8 Srovnání molekulárních metod s ELISA metodou, mikrospickými metodami

Molekulární metody se využívají pro detekci a identifikaci patogenů (především virů) na základě sekvence; na rozdíl od ELISA kde rozdílné kmeny mohou mít stejné protilátky. Dále je možná kvantifikace napadení. Také molekulární metody mají vyšší specificitu, oproti ELISA kde může dojít k tzv. „cross“ reakcím. Oproti morfologickým metodám jsou molekulární metody sice objektivnější, ale dražší. Morfologické metody jsou subjektivnější a náročnější na zkušenost hodnotitele.

3.9 Využití molekulárních metod

V práci je použito hodnocení virové zakrslosti pšenice (WDV) s využitím molekulární metody PCR.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Charakteristika stanoviště

Pokus byl proveden na školním pozemku v Žabčicích. Pozemek se nacházel v blízkosti železniční tratě a jiného zatravněného neudržovaného pozemku. Žabčice leží 182 m. n. m. v Jihomoravském kraji, okres Brno-venkov. Tato oblast patří do suché teplé kukuřičné oblasti a 70 % tvoří lehké písčité půdy.

4.2 Charakteristika použitých odrůd

Výskyt WDV byl hodnocen v porostech 2 odrůd pšenice ozimé; hybridní německé odrůdy Hybnos a maďarské odrůdy Mv Vekni.

4.3 Charakteristika pokusu

Na začátku září 2015, byl založen maloparcelkový pokus na školním pozemku v Žabčicích. Velikost každé parcely byla 90 × 110 cm, do 6 řádků, které byly od sebe vzdáleny 12 cm, bylo vyseto 30 semen pšenice ozimé. Pšenice byla vyseta ve 3 náhodných opakováních.

Z prostředních řádků parcel byly odebrány 2-3 listy z 8-9 rostlin jdoucích za sebou a tyto rostliny byly označeny pro další letní odběr. Dohromady tak celkem bylo testováno 50 rostlin. Při odběru nebyly v porostu patrné žádné symptomy napadení virovými ani houbovými patogeny. Odběr vzorků listů proběhl v období počátku regenerace porostu po zimě (25. 2. 2016). Po odběru byly vzorky popsány a uloženy do mrazícího boxu. Z každého vzorku bylo použito 50 mg listového pletiva pro izolaci DNA.

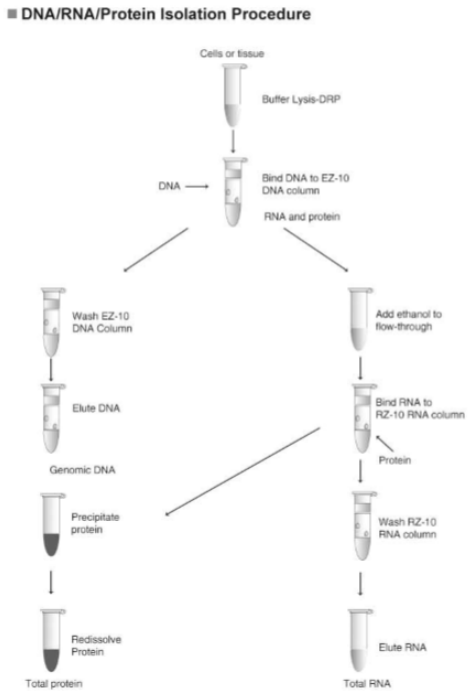
V porostu byl následně ve 2 termínech (29. 4. 2016 a 17. 5. 2016) hodnocen výskyt symptomů případné sledované virové infekce.

4.4 Izolace DNA z rostlinného materiálu

Z důvodu směsné infekce pšenice viry WDV (DNA viry) i BYDV (RNA viry) byl pro izolaci DNA použit All-In-One Mini-Preps Kit (Bio Basic, Canada Inc), který umožňuje izolaci DNA, RNA případně i proteinů z jednoho vzorku.

Při první izolaci bylo řeba promývací roztoky doplnit určitým množstvím etanolu a předchladit mikrocentrifugu na 4 °C. Poté následovala samotná izolace. Do mikrozkumavek bylo napipetováno 350 µl Buffer Lysis-DR, rozdrceno 50 mg pletiva rostlinného materiálu ve třecích miskách spolu s tekutým dusíkem. Vzniklý prášek byl ihned přenesen do mikrozkumavek s pufrem a vortexováno. Následovala centrifugace 3 minuty při 4 ºC, 10 000 rpm. Supertant byl přenesen na kolonu EZ-10 umístěnou ve 2 ml zkumavce a znovu centrifugován 1 minutu, 8 000 rpm. DNA zůstala na membráně kolony EZ-10, RNA protekla do mikrozkumavky. Frakce s RNA byla uložena v mikrozkumavkách při 4 ºC pro následnou izolaci. Izolace RNA nebyla potřebná pro mou práci, proto zde není popsán další postup její izolace.

K izolátu DNA bylo přidáno 350 µl pufru Lysis-DR, a vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 9 000 rpm. Kolona EZ-10 byla umístěna do nové zkumavky, a na kolonu bylo přidáno 500 µl pufru CW1, následovala centrifugace 1 minutu při 9 000 rpm. Proteklá frakce se po každém kroku vždy vylévá. Poté byl na kolonu přidán pufr CW2 (500 µl), následovala centrifugace1 minutu při 9 000 rpm Následně byly vzorky vysušeny (proběhla centrifugace naprázdno pro odstranění zbylého etanolu). Zbylá frakce byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky. V posledním kroku bylo na membránu kolony přidáno 50 µl předehřátého elučního pufru CE a poté proběhla poslední centrifugace 2 minuty, 9 000 rpm. Proteklá frakce obsahovala izolovanou DNA, z níž byla následně provedena detekce WDV.



Obr.č. 4 All-In-One Mini-Preps Kit (Bio Basic, Canada Inc)

Po izolaci bylo provedeno u všech vzorků spektrofotometrické hodnocení kvality a čistoty DNA. Následně byly všechny vzorky naředěny na stejnou koncentraci nukleových kyselin (15 ng/µl vzorku).

4.5 PCR detekce

PCR byla provedena s primery a za podmínek dle Benkovics *et al.*, (2010).

Složení použitáé reakční směsi:

- deionizovaná. voda 19,7 µl
- 10 × P (15 mM $MgCl_2$) 2,5 µl
- dNTP Mix (10mM) 0,5 µl
- primer A (20 µM) 0,6 µl
- primer B (reverse) (20 µM) 0,6 µl
- Taq polymeráza 0,1 µl (1 U)
- Templátová DNA 1 µl (asi 10 ng)

Celkový objem směsi byl 25 µl. Použitý kit od firmy Qiagen (Kanada).

Reakční podmínky pro PCR reakci

- 94ºC 3 min
- 30 cyklů:
    - 94 ºC 20 s,
    - 55 ºC 15 s
    - 72 ºC 15 s
- 72 ºC 5 min

Poté byl PCR produkt vizualizován elektroforézou na 2% agarózovém gelu.

4.6 Hodnocení vzorků s využitím elektroforézy

Pro elektroforézu byl použit univerzální 2 % agarózový gel, složený z 2,8 g agarózy, 140 ml TBE pufru (Tris, kyselina boritá, EDTA, pH = 8). Těsně před polymerizací bylo do gelu přidáno 5 µl fluorescenční barvy pro zobrazení výsledných proužků.

Na gel byly naneseny kromě vlastních vzorků vždy jedna pozitivní kontrola (infikovaná rostlina z nezávislého experimentu, ověřená ELISA; K+) a dvě negativní kontroly.

Jedna ze zdravé rostliny (rostlina ze zdravého porostu; K-) a vzorek bez DNA (K--). Příklad gelu pro odrůdu Hybnos příloha č.1 , příklad gelu pro odrůdu Mv Vekni příloha č. 2.

4.7 Hodnocení symptomů v porostu

Symptomy infekce byly hodnoceny pouze vizuálně (+/-), ve dvou termínech, tj. 25. 2. 2016 a 29. 4. 2016. Dne 17. 5. 2016 byly rostliny vytaženy z půdy a změřena a zvážena nadzemní část. Poškození rostlin je vyjádřeno v % vzhledem k průměrné délce (cm) a hmotnosti (g) bezsymptomatických rostlin dané odrůdy (průměr počítán ze 3 rostlin). Dne 29. 4. 2016 byly z každé parcely hodnoceny rostliny, které vykazovaly zřejmé symptomy napadení virem WDV.

Obr.č. 5 Symptomatická rostlina infikovaná virem WDV v porostu pšenice v dubnovém termínu (není součást pokusu)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V maloparcelkovém pokusu v porostu pšenice ozimé infekci virem sledován přirozený výskyt viru WDV. Výsledky hodnocení infekce pšenice ozimé virem WDV a projevů symptomů (WDV a BYDV) u sledovaných rostlin odrůd Hybnos a Mv Vekni jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Z důvodu možné směsné infekce, která by mohla ovlivnit projevy symptomů, jsou uváděny hodnoty BYDV*. Hodnocení infekce BYDV* bylo provedeno v rámci bakalářské práce Yulity Sukharukava.

Tabulka č. 1 Hodnocení infekce pšenice ozimé viry WDV, BYDVu odrůdy Hybnos, r. 2016

	Odběr a symptomy 25. 2. 2016			symptomy 29. 4.	symptomy 17. 5.	
Odr./č.rostliny	WDV	BYDV*	symptomy	WDV+BYDV	Hmotnost celé rostliny %	Výška celé rostliny %
H1/1	+	+	-	-	63	96
H1/2	+	-	-	-	46	102
H1/3	+	-	-	-	37	102
H1/4	-	+	-	-	78	102
H1/5	-	-	-	-	37	96
H1/6	+	-	-	+	14	92
H1/7	+	-	-	-	132	102
H1/8	-	-	-	+	12	86
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	27	84
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	10	84
ZDR	-	-	-	-	134	102
H2/1	-	-	-	+	21	85
H2/2	-	-	-	-	44	96
H2/3	-	-	-	-	34	96
H2/4	+	-	-	-	46	96
H2/5	+	-	-	-	65	108
H2/6	-	-	-	-	63	108
H2/7	**+ +**	-	-	-	32	96
H2/8	+	-	-	+	25	90
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	19	72
ZDR	-	-	-	-	103	102
H3/1	**+ +**	-	-	+	26	90
H3/2	-	-	-	-	76	96
H3/3	-	(+)	-	-	38	96
H3/4	-	-	-	-	53	96
H3/5	-	-	-	-	62	96
H3/6	-	-	-	-	60	96
H3/7	-	-	-	-	34	102
H3/8	-	+	-	-	67	96
H3/9	-	-	-	-	34	96
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	28	78
ZDR	-	-	-	-	63	96
ZDR průměr					100	100

Vysvětlivky: S+ pozitivní kontrola
ZDR negativní kontrola
infikovaná rostlina + + Silně pozitivní reakce
+ Slabě pozitivní reakce
- Negativní reakce

Tabulka č. 1 Hodnocení infekce pšenice ozimé viry WDV, BYDV u odrůdy Mv Vekni, r. 2016

	Odběr a symptomy 25. 2. 2016			symptomy 29. 4.	symptomy 17. 5.	
Odr./č. rostliny	WDV	BYDV	symptomy	WDV+BYDV	Hmotnost celé rostliny %	Výška celé rostliny %
V1/1	-	-	-	+	8	64
V1/2	-	-	-	-	49	71
V1/3	-	-	-	-	34	90
V1/4	-	-	-	+	21	76
V1/5	-	-	-	-	13	87
V1/6	-	-	-	+	10	69
V1/7	-	-	-	+	10	57
V1/8	-	-	-	-	45	74
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	30	69
ZDR	-	-	-	-	102	94
V2/1	-	-	-	-	50	97
V2/2	-	-	-	-	63	103
V2/3	-	-	-	-	54	92
V2/4	-	-	-	-	37	92
V2/5	-	(+)	-	-	65	103
V2/6	-	(+)	-	+	20	86
V2/7	-	-	-	-	26	103
V2/8	-	-	-	-	0	0
S+	nehodnoceno	nehodnoceno	-	+	52	80
ZDR	-	-	-	-	90	103
V3/1	-	-	-	+	4	46
V3/2	-	-	-	-	50	92
V3/3	-	-	-	-	122	103
V3/4	-	++	-	-	30	80
V3/5	-	-	-	-	64	103
V3/6	-	-	-	+	4	57
V3/7	-	-	-	+	3	46
V3/8	-	-	-	-	71	103
V3/9	-	-	-	? (+)	20	86
S+	nehodnoceno	Nehodnoceno	-	-	8	57
ZDR	-	-	-	-	108	103
ZDR průměr					100	100

Vysvětlivky: S+ pozitivní kontrola
ZDR negativní kontrola
infikovaná rostlina
+ + Silně pozitivní reakce
\+ Slabě pozitivní reakce
\- Negativní reakce

V prvním termínu (25. 2. 2016) hodnocení napadení pšenice ozimé virem WDV rostliny nevykazovaly žádné symptomy infekce. Vybrané rostliny se nijak nelišily od rostlin v porostu. Z tabulek vyplývá že, z odebraných bezsymptomatických vzorků (koncem února 2016) byly silně infikovány WDV dvě rostliny odrůdy Hybnos (H2/7, H3/1) a u dalších 8 rostlin odrůdy Hybnos byla prokázána slabá infekce.(Tab. č. 1). U rostlin odrůdy Mv Vekni nebyl WDV detekován v žádné sledované rostlině. Na základě tohoto výsledku lze předpokládat, že odrůda Mv Vekni vykazuje vyšší odolnost vůčiviru WDV. Náš výsledek se shoduje se závěry Benkovics *et al.* (2010), kteří hodnotili citlivost 4 odrůd pšenice ozimé k viru WDV. Podobnou míru tolerance vykazovala ještě další jimi sledovaná odrůda Mv Dalma, přičemž autoři diskutují přítomnost nějakého typu přirozené odolnosti u těchto dvou odrůd. Doposud nebyly identifikovány konkrétní geny odolnosti proti WDV. I když v našem experimentu rostliny nevykazovaly v prvním termínu žádné symptomy napadení viry, molekulární analýzou byla prokázána u některých rostlin tzv. primární infekce. Výskyt primární infekce v porostu pšenice ozimé v České Republice dokumentují Širlová *et al.* (2005). Autoři poukazují na vliv ročníku, především s mírnější zimou, na výskyt infekce. Po mrazivé zimě, bez pokryvu sněhu, byl primární výskyt infekce nižší, částečně i proto, že mnoho rostlin zmrzlo. Tyto údaje se shodují s podmínkami našeho experimentu. Zima 2015/2016 byla mírná, rostliny dobře přezimovaly a nebyly poškozeny mrazem.

Směsná infekce oběma viry byla zjištěna pouze v jednom případě u odrůdy Hybnos (H1/1). Bukvayová, *et al.* (2006) uvádějí, že některé roky převládá BYDV a jiné roky WDV, vyloučena není ani směsná infekce oběma viry.

5.1 Hodnocení symptomů

V průběhu vegetační doby 2016 se v porostech začaly v polovině dubna objevovat rostliny vykazující slabé symptomy napadení (tab. 1, 2). U rostlin, které byly v tomto období ve fázi sloupkování, byla ovlivněna pouze výška a rostliny se zdály celkově slabší (tab. 1, 2). V rámci původně sledovaných odrůd, větší počet symptomatických se vyskytoval u odrůdy Mv Vekni. Pro další porovnání byly v této fázi v každé variantě vybrány rostliny s relativně nejsilnějšími projevy symptomů (S+). U těchto rostlin byla v posledním termínu hodnocení prokázána pouze infekce BYDV (data nejsou součástí

této práce). Tyto rostliny se vyskytovaly jak u odrůdy Hybnos, tak u odrůdy Mv Vekni, což také odpovídá spíše infekci BYDV. Další vývoj symptomů byl vyhodnocen 17. 5. 2016. Výška rostlin odrůdy Hybnos nebyla téměř vůbec ovlivněna nebo u původně hodnocených rostlin byla maximálně o 14 % snížena (H1/8). Avšak u této rostliny nebyly v únorovém termínu hodnocení molekulárně identifikované žádné viry. Je pravděpodobné, že v případě, že se jedná o symptomy virózy, by způsobeny pravděpodobně sekundární infekcí. Hmotnost rostlin byla ovlivněna od 22 % (H1/4) do 88 % H1/8). U rostlin odrůdy Mv Vekni bylo pozorováno u testovaných rostlin větší poškození, tj. potlačení růstu než o odrůdy Hybnos (64 % V3/1, V3/8). Ještě více se symptomy projevily na hmotnosti rostlin, ale je nutno zdůraznit že hmotnost mohla být snížena z různých důvodů (obr. č. 5 projevy žloutnutí listů nebyly pozorovány). Dle Ripl *et al.* (2008) je jedním z příznaků žloutnutí a odumírání listů. Z výsledků hodnocení primární infekce a výsledných symptomů vyplývá, že porosty byly sekundárně infikovány jedním nebo oběma viry, přičemž silnější rostliny hybridní odrůdy Hybnos této infekci odolaly lépe než rostliny odrůdy Mv Vekni. Vzhledem k tomu, že odrůda Mv Vekni je částečně odolná k WDV (Benkovics *et al.,* 2010) mohlo by se jednat spíše o sekundární infekci BYDV. Infekce WDV, prokázaná u 10 rostlin odrůdy Hybnos, neovlivnila dlouživý růst. Může se jedna ale i o vliv ročníku, případně v roce 2016 byl více rozšířen virus BYDV.

5.2 Porovnání nukleových sekvencí WDV v GenBank z hlediska jejich podobnosti v oblasti námi použitých primerů

Ověření specificity PCR produktu bylo provedeno porovnáním velikosti specifického PCR produktu s úsekem ohraničeným primery v sekvenci dostupné v GenBank (AJ311031.1). Námi použité primery byly navrženy Benkovics *et al.*, (2010).

Sekvence byla vyhledána v NCBI Genbank databázi a zjistilo se že, se jedná o sekvenci která má mít 410 pb.(Příloha č. 3). Tato velikost odpovídá velikosti produktu, které byly syntetizovány v naší reakci (viz příloha č.1a 2). Může být tedy potvrzena specificita dané reakce. Dle sekvence v příloze je zřejmé, že primery byly navrženy do oblasti genu (repA), který kóduje protein zapojený v replikaci viru (Benkovics *et al*., 2010).

Jarošová *et al*. (2016) navrhli primery do genu pro pláštový protein (příloha č. 3). Výhodou tohoto primeru je, že namnoží úsek, který dokáže rozlišit kmeny pšeničný a ječný.

Pomocí programu Blast v GenBank byly vyhledány další sekvence WDV. Porovnáním této sekvence s podobnými sekvencemi v GenBank bylo nalezeno asi 200 délkově shodných (2750 pb) sekvencí odpovídajících celkové délce WDV a představujících izoláty různého původu a hostitele, což nasvědčuje o relativně velké variabilitě viru WDV.

Z vyhledaných sekvencí bylo vybráno 10, u nichž vzhledem k odlišným hostitelům (pšenice/ječmen), se předpokládala přítomnost odlišných kmenů. Úseky odpovídající našemu PCR produktu byly porovnány pomocí programu Clustal Omega s cílem zjistit, zda použité primery byly navrženy do konzervativní oblasti (příloha č. 4).

Vybrané sekvence

Sekvence	Hostitelská rostlina	Země původu
KJ536128	*Triticum aestivum*	Čína
KU877914	*Triticum aestivum*	Irán
KM079155	*Hordeum vulgare*	Polsko
FJ546181	*Hordeum vulgare*	Česká Republika
FM999833	*Hordeum vulgare*	Maďarsko
AM922262	*Hordeum vulgare*	Německo
JQ647458	*Triticum aestivum*	Maďarsko
AJ311031	*Triticum aestivum*	Švédsko
KX533461	*Psammotettix alienus*	Irán
AM296019	*Hordeum vulgare*	Česká Republika

Umístěním použitých primerů dle Benkovics *et al*. (2010) do sekvencí bylo zjištěno, že primer WDV Rep-R má v poloze 15 od 5´konce chybně začleněno C místo G, tento nukleotid neodpovídá žádné sekvenci. Prvních 10 nukleotidů primeru WDV Rep-R není specifických k virové sekvenci, jde o přidaný polylinker, který autoři pravděpodobně využili při sekvenování. I přesto reakce PCR fungovala. Větší odlišnosti byly zjištěny u izolátu AM296019. V případě tohoto izolátu by navržený primer pravděpodobně nefungoval. U primeru WDV Rep-F byly nalezeny dvě odlišné baze u izolátů KJ536128, AJ311031, což znamená, že reakce není plně univerzální.(příloha č. 4).

6 ZÁVĚR

- V teoretické části byl vypracován přehled imunochemických a molekulárních metod, které lze využívat pro detekci rostlinných patogenů. Bylo provedeno srovnání možnosti použití a výhod molekulárních metod, které se vzhledem k rozvoji molekulárních technik stále častěji zapojují do klasické detekce fytopatogenů.
- Příklad využití molekulární detekce byl proveden na identifikaci primární infekce WDV v porostu pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) u rostlin které nevykazovaly v době odběru žádné symptomy napadení. Porosty byly vyhodnoceny opakovaně vzhledem k rozvoji symptomů, přičemž bylo zjištěno že, primární infekce WDV byla prokázána pouze u rostlin odrůdy Hybnos. U rostlin odolnější odrůdy Mv Vekni nebyla primární infekce WDV prokázána ani v jednom případě. Při hodnocení v květnu 2016 byly pozorovány symptomy napadení sledovanými viry u rostlin obou odrůd. Předpokládám proto, že v porostu převažovala infekce BYDV.
- Hodnocením sekvencí viru WDV z GenBank bylo zjištěno že, použité primery dle Benkovics *et al.(*2010) nemusejí být univerzální pro všechny uveřejněné sekvence. Je na zvážení zda pro rutinní detekci WDV pomocí PCR není vhodnější používat primery dle metodiky Jarošová *et al*. (2016).

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Agdia Handbook *ImmunoStrip® and ImmunoComb® Tests*. Elkhart, 2016.

AYALA L., VAN GINKEL M., KELLER B., HENRY M., SINGH R., 2002: Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat. Euphytica (128): 249—259.

BARTUŠKOVÁ I., 2007: Stanovení rostlinných viróz metodou DAS ELISA a stanovení přítomnosti GMO metodou PCR. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2007. Jednotné pracovní postupy. ISBN 9788086548913.

BENKOVICS A. H., VIDA G., NELSON D., VEISZ O., BEDFORD I., SILHAVÝ D., BOULTON M. I., 2010: Partial resistence to Wheat dwarf virus in winter wheat cultivars. Plant Pathology (59): 1144—1151.

BUKVAYOVÁ N., HENSELOVÁ M., VAJCÍKOVÁ V., KORMANOVÁ T., 2006: Occurrence of dwarf virus of winter wheat and barely in several regions of Slovakia during the growing seasons 2001-2004. Agriculture journals (9): 392—401.

BÜLOW L., SCHINDLER M., CHOI C., HEHL R., 2004: PathoPlant® :A Database on Plant-Pathogen Interactions. In Silico Biology (4): 529—536.

CHMELÍK J., 2005 Proteomický průvodce. Chem. Listy (99): 883—885.

CHARLERMROJ R, HIMANANTO O, SEEPIBAN C, KUMPOOSIRI M, WARIN N, OPLATOWSKA M.,2013: Multiplex Detection of Plant Pathogens Using a Microsphere Immunoassay Technology. PLoS ONE (e62344).(online dostupné z https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062344) [citace 17-04-2017].

CIBIČEK N., VACEK J., 2014: Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.

CLARK M. F., ADAMS A. N., 1977: Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journals Virology (34): 475—483.

CORREA R. L., SILVA T. F., SIMOES ARAÚJO J. L., BARROSO P. A., VIDAL M. S., VASLIN M. F. S., 2005: Molecular charakterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. Archives of Virology (150): 1357—1367.

CRAIG *et al.*, 2014: Molecular biology: principles of genome function. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, c2014. ISBN 978-0-19-965857-2.

D´ARCY C. J., 1995: Barley Yellow Dwarf 40 Years of Progress. 1995.

DUNBAR S. A., 2006*:* Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clinica Chimica (1-2): 71—82.

DVOŘÁK M., MATĚJOVIČOVÁ M., 2008: Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. Chem. Listy (102): 977—983.

EDWARDS K., JOHNSTONE C., THOMPSON C., 1991: A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis.Nucleic Acids Reseach (19):1349. (online dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC333874/pdf/nar00242-0175.pdf) [citace 17-04-2017].

GARCIA A. A. F., BENCHIMOL L. L.' BARBOSA A. M. M., GERALDI I. O.; CLÁUDIO L. S.; DE SOUZA A. P., 2004: Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. Genetics and Molecular biology (27).

GARCIA M. L., SANCHEZ DE LA TORRE M. E., DALBO E., DJELOUAH K., ROUAG N., LUISONI E., MILNE R. G., GRAU O., 1997: Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCr and DAS-ELISA. Plant Pathology (46): 830—836.

GIBSON U. E. M., HEID CH. A., WILLIAMS P. M., 2011: A Novel Method for Real Time Quantitative RT – PCR. Cold Spring Harbor Laboratory Press (6): 995—1001. (online dostupné zhttps://www.researchgate.net/profile/P_Williams/publication/14297603_A_novel_method_for_Real_time_quantitative_RT-PCR/links/566eefb808ae0e4446b4090b.pdf) [citace 17-04-2017]

HAYES R. J., MACDONALD H., COUTTS R. H., BUCK K. W., 1988: Priming of Complementary DNA Synthesis in vitro by Small DNA Moleculer Tighly Bound to Virion DNA of Wheat Dwarf Virus. Journal Virology (69): 1345—1350.

HEALY D. A., HAYES C. J., LEONARD P., MCKENNA L., O´KENNEDY R., 2007 Biosensor developments application to prostate-specific antigen detection. ScienceDirect (25): 125—132. (online dostupné z http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.571.3710&rep=rep1&type=pdf) [citace 21-04-2017].

HENEGARIU O., HEEREMA N. A., DLOUHY S. R., VANCE G. H., VOGT P. H., 1997: Multiplex PCR: Critical Parameters and Step by Step Protocol. BioTechniques (23): 504—511. (online dostupné z https://www.researchgate.net/profile/Octavian_Henegariu/publication/13923521_Multiplex_PCR_Critical_parameters_and_step-by-step_protocol/links/53d92a9f0cf2e38c6331f15d.pdf) [citace 21-04-2017].

HOBZA R., 2003: Od mikrodisekce k mapování struktury genomu. Biolog. Listy (68): 179—182.

HODEK J., OVESNÁ J., PAVLÁTOVÁ L., 2008: Metodika detekce geneticky modifikované papáji linií 55-1 a 63-1. Výzkumný ústav rostlinné výroby 2008. ISBN 978-80-87011-96-6.

HOGENHOUT S. A., AMMAR E. D., WHITFIELD A. E., REDINBAUGH M. G., MARGARET G., 2008 Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. Annual Review of Phytopathology (46): 327—359.

HOŘEJŠÍ V., BARTŮŇKOVÁ J., 2005: Základy imunologie. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.

JAŇOUROVÁ B., RIPL J., KUMAR J., 2009: Metodika detekce pšeničného a ječného kmene viru zakrslosti pšenice v jejich vektoru křísku polním pomocí PCR - RFLP: [metodika pro Státní rostlinolékařskou správu]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009. ISBN 9788074270277.

JAROŠOVÁ J., POLÁK J., KUMAR J., 2008: Metodika molekulární detekce virů peckovin pomocí RT-PCR a multiplex-RT-PCR. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008. ISBN 9788087011867.

JAROŠOVÁ J., JAŇOUROVÁ B., KUMAR J., 2009: Metodika molekulární detekce viru žluté zakrslosti ječmene v jeho vektorech pomocí RT-PCR: [metodika pro Státní rostlinolékařskou správu]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009. ISBN 9788074270260.

JAROŠOVÁ J., KUNDU J., 2010: Validation of reference genes as internal control for studiying viral infections in cereals by quantitative real time RT-PCR. BMC Plant Biology (10:146). (online dostupné z https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-10-146) [citace 17-04-2017].

JAROŠOVÁ J., DRÁB T., BEONI E., KUMAR J.,2016: Metodika detekce virů obilnin a trav pomocí SYBR Green I RT-qPCR. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2016. ISBN 9788074272042.

KAŠIČKA V., 1997: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chem.listy (91): 320—329.

KOKLU G., 2005: Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. Phyloprotection (85): 19—25.

KUNDU J., JAROŠOVÁ J., GADIOU S., ČERVENÁ G., 2009: Discrimination of Three BYDV Species by One-step RT-PCR-RFLP and Sequence Based Methods in Cereal Plants from the Czech Republic. Cereal Research Communications (37): 541—550.

KŘÍŽEK T., COUFAL P., BOSÁKOVÁ Z., TESAŘOVÁ E., SOBOTNÍKOVÁ-SUCHÁNKOVÁ J., 2009: Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. Chem. Listy (103): 130—135.

LEE C., KIM J., SHIN S. G., HWANG S., 2006: Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. Journal of Biotechnology (123): 273—280.

LOPEZ M. M., BERTOLINI E., OLMOS A., CARUSO P., GORRIS M. T., LLOP P., PENYALVER R., CAMBRA M., 2003: Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. Int Microbiol.(6): 233—243.

MALLIK I., ANDERSON N. R., GUDMESTAD N. C., 2012: Detection and Differentiation of Potato Virus Y Strains from Potato Using Immunocapture Multiplex RT-PCR. Am. J. Pot Res (89): 184—191.

MANURUNG B., WITSACK W., MEHNER S., GRUNTZING M., FUCHS E., 2005: Studies on biology and population dynamics of the leafhopper Psammotettix alienus as vector of Wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. Journal of Plant Diseases and Protection (112): 497—507.

MCCARTNEY H. A., FOSTER S. J., FRAAIJE B. A., WARD E., 2003: Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest. Manag. Science (59): 129—142.

MILLER W. A., RASOCHOVÁ L., 1997: Barley Yellow Dwarf Viruses. Phytopathology (35): 167—190.

MOTER A., GOBEL B., 2000: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. Journal of Microbiological Methods (41):85—112.

NOLASCO G., DE BLAS C., TORRES V., PONZ F., 1993: A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Metods (45): 201—218.

PERRY K. L., KOLB F. L., SAMONS B., LAWSON C., CISAR G., OHM H., 2000: Yield Effects of Barley yellow dwarf virus in Soft Red Winter Wheat. The American Phytopathological Society (90): 1043—1047.

POITRAS E., HOUDE A., 2002: La PCR en temps réel: principes et applications. Biology and Biotechnology(2): 2—11.(online dostupné z http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~lampronp/files/qPCR.pdf) [citace 20-04-2017].

PROKINOVÁ E., VÁŇOVÁ M., KOCHANOVÁ M., 2009: Choroby obilnin – stav, perspektivy. Osivo a sadba: 21—28.

PTÁČEK J., KOPEK J., DEDIC P., MATOUSEK J., 2002: *Immunocapture RT-PCR probing of potato virus Y isolates.* Acta Virologica (46): 63—68.

RASTGOU M., KHATABI B., KVARNHEDEN A., IZADPANAH K., 2005: Relationships of Barley yellow dwarf virus-PAV and Cereal yellow dwarf virus-RPV from Iran with viruses of the family Luteoviridae. Eur. J. Plant Pathology (113): 321—326.

RIPL J., HOLÝ K., KOCOUREK F., KUMAR J., 2008: Metodika ochrany obilnin proti viru zakrslosti pšenice a jeho vektoru křísku polnímu. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008. ISBN 978-80-87011-84-3.

RYŠAVÝ P., BARTUŠKOVÁ I., VČELÁKOVÁ J., SOUKUPOVÁ J., 2002: Využití metody ELISA v rostlinné diagnostice. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002. Jednotné pracovní postupy. ISBN 80-86548-08-2

SÁNCHEZ C. F., MCNEIL C. J., RAWSON K., NILSSON O., LEUNG H. Y., GNANAPRAGASAM V., 2005: One- step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. Journal of Immunological Methods (307):1—12.

SCHALK H. J., MATZEIT V., SCHILLER B., SCHELL J., GRONENBORN B., 1989: Wheat dwarf virus, a geminivirus of graminaceous plants needs splicing for replication. The EMBO Journal (8): 359—364.

SNUSTAD P., SIMMONS J., RELICHOVÁ J., MENDEL J.G., 2009*: Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 9788021048522.

STRELKOV S., LAMARI L., 2003: Host-parasite interactions in tan spot of wheat. Canadian Journal of Plant Pathology (25): 339—349.

SYAMKUMAR S., LOWARENCE B., SASIKUMAR B. , 2003:Isolation and amplification of DNA from rhizomes of tumeric and ginger. Plant Molecular Biology Reporter (21): 171.

ŠIRLOVÁ L., VACKE J., CHALOUPKOVÁ M., Reaction of selected Winter Wheat Varieties to Autumnal Infection with Whet Fwarf Virus. Plant Protect Science (41): 1—7.

ŠMARDA J., 2005: Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

TARGOŠOVÁ K., KUČERA M., HRABOVSKÁ A., 2016: Využitie metody ELISA na študium enzýmovej hydrolýzy butyrylcholínesterázy v biologickom materiáli. Chem. Listy (110): 452—455.

TEULON D. A. J., STUFKENS M. A. W., NICOL D., HARCOURT S.J., 1999: Forecasting barely yellow dwarf virus in autumn-sown cereals in 1998. Plant Protection Conf. 1999: 187—191. (online dostupné z https://www.nzpps.org/journal/52/nzpp_521870.pdf)[citace 20-04-2017]

URLICH G., MULLER W., WOLFENBARGER L., 1999: AFLP genotyping and fingerprinting. TREE (14): 389—394.

VACKE J., CIBULKA R., 2000: Comparison of DAS ELISA and enzyme amplified ELISA for detection of wheat dwarf virus in host plants and leafhopper vectors. Plant Protection Science (36): 41—45.

VÁŇA P., ŠMARDA J., 2004: Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu. Chem. Listy (98): 1130—1134.

VAŘILOVÁ T., 2005: Stacionární fáze v afinitní chromatografii. Chem. Listy (99): 570—577.

VÍTÁMVÁS P., KOSOVÁ K., ŠKODÁČEK Z., PRÁŠIL I. T., 2010: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. Chem. Listy (104): 671—676.

WANG Y., MAO Q., LIU W., MAR T., WEI T., LIU Y., WANG X., 2014: Localization and Distubution of Wheat dwarf virus in its vector leafhopper, Psammotettix alienus. Phytopathology (104): 897—903.

WIRTZ R. A., ZAVALA F., CHAROENVIT Y., CAMBELL G. H., BURKOT T. R., SCHEIDER I., ESSER K. M., BEAUDOIN R. L., ANDRE R. G., 1987: Comparative testing of monoclonal antibodies against Plasmodium falciparum sporozoites for ELISA development. Bulletin of the World Health Organization (65): 39—45.

ZHANG X., ZHOU G., WANG X., 2010: Detection Wheat Dwarf Virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (Psammotettix alienus) by real time PCR. Journal of Virological Methods (169): 416—419.

8 SEZNAM ZKRATEK

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

BMV (Brome Mosaic Virus) - virová mozaika pšenice

BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus) - virová žlutá zakrslost pšenice

cDNA – komplementární DNA dle RNA

CYDV (Cereal Yellow Dwarf Virus) - virová žlutá zakrnělost obilnin

DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) - sendvičová technika ELISA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP - deoxyribonukleosidtrifosfát

dsDNA – dvouvláknová DNA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) – enzym-imunosorpční test

EWSMV (European Wheat Striate Mosaic Virus) - virová pruhovitá mozaika pšenice

FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) - fluorescenční in situ hybridizace

NCBI (National Center for Biotechnology Information) - Národní centrum pro biotechnologické informace

pb – párů bazí

PCR (Polymerase Chain Reaction) – řetězová polymerázová reakce

qPCR (Quantitative PCR) – kvantitativní PCR

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RNA – ribonukleová kyselina

rpm (revolutions per minute) – otáčky za minutu

RT PCR (Reverse Transcription PCR) – reverzní transkripce PCR

Taq polymeráza - termostabilní DNA polymeráza z bakterie Thermus aquaticus

WDV (Wheat Dwarf Virus) - virová zakrslost pšenice

WSMV (Wheat Streak Mosaic Virus) - virová čárkovitá mozaika pšenice

9 SEZNAM PŘÍLOH

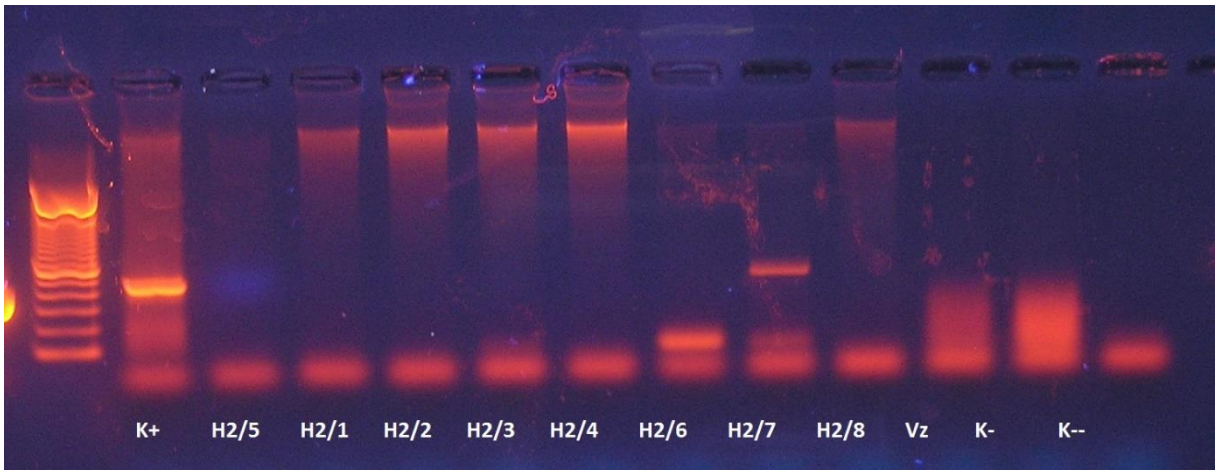
Příloha č. 1 – Výsledek elektroforézy odrůdy Hybnos

Příloha č. 2 – Výsledek elektroforézy odrůdy Mv Vekni

Příloha č. 3 – Výsledná sekvence viru WDV

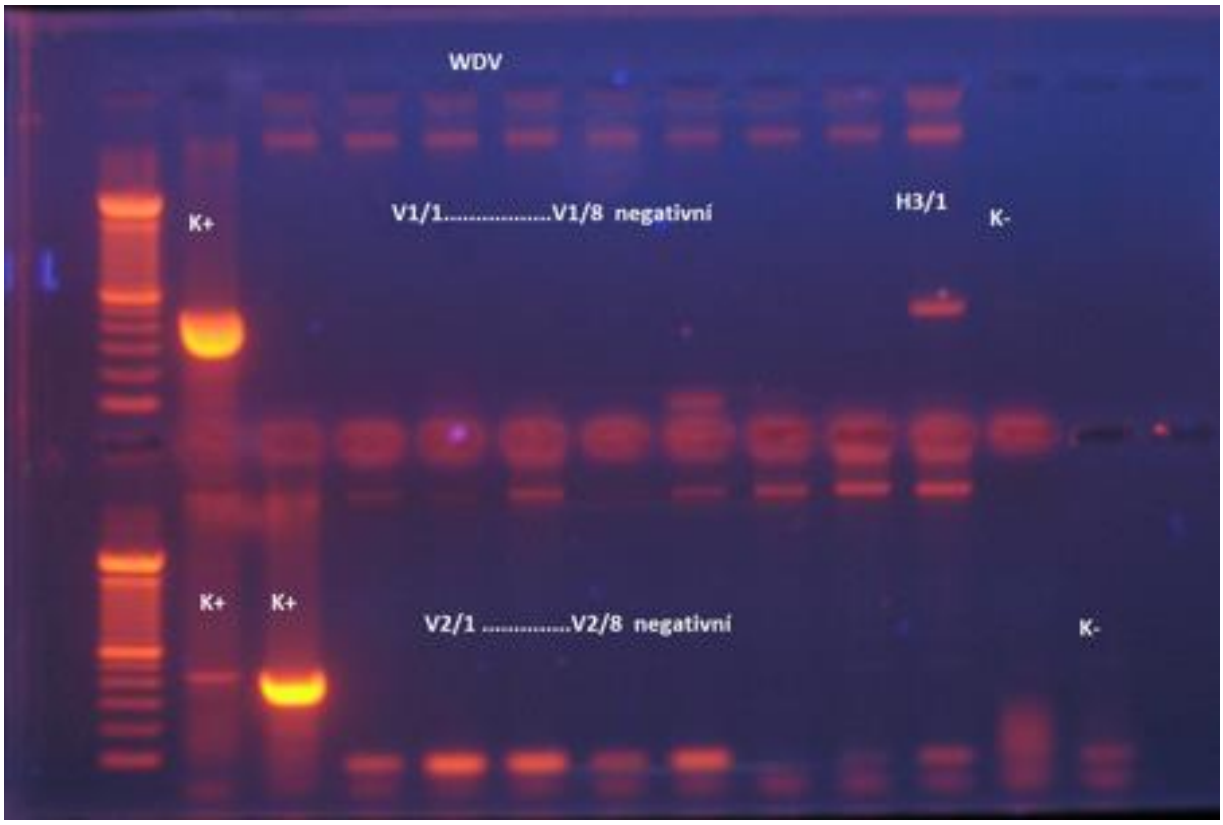
Příloha č. 4 – Ořezané sekvence s navrhnutými primery

Příloha č. 1



Výsledek elektroforézy odrůdy Hybnos

Příloha č. 2



Příloha č. 3 Výsledná sekvence WDV

```
1    accctgcgtg gtgggtcccg aggcgcactc ggcttttcgt gagtgcgccg aggcttttgg
61   accacgtctt tatgtcatca catcaattat tggtggtgag tcatcacata ttccacctgc
121  tattatgtcc catcgcttag cttataagga agtgtcgggg aaggtatctc gatggatcag
181  gtctttacac cgccgcgttc tatacgggca gatcaatacc aggcccctta cgatcccggg
241  tcctccgact acgcccggcg gacctttgtg ttcgtctcct tcggtttgtt aatatccgta
301  ggagttgttt ggttggctta cactctgttc ttgaaggact gcatattagt gtggaaggcg
361  aagaagcaga ggaggaccga ggaaattggt tacggtaata caccggccag accaaatggt
421  gaccaacaag gactcccgag gtaagggaaa gaggaagctc gaggagggcg aattgagtgg
481  aaggtggaag gggcaagtgt ataagcggcg taagcagacc tacaaggtag tacctgtgag
541  gccacccgcc ctgtgtgtgt accggtataa ctggctcaat tcagacaaga ccaatatcgt
601  ggtgggtaac acccctcgga ttgatctgat tacctgcttt gcagcgggca aggccgataa
661  taatcggcat acaaatcaga ccgtcctcta caagtttaac ctacagggga cctgttacgt
721  gtcggactcc tcatgtatgt tcataacccc aatcagggtt tatcactggt tggtctatga
781  tgcagagccg aagcaggcta cgcctgactc cactgacatc tttacgatgc cttggaatct
841  gctgccgagt tcatggactg tgcagagggc ttggtcgcat cggttcgtgg tgaagaggaa
901  gtggtgcgtg aacctggtct ccgatggaag gaaggttgga tccaagacgg tggactcccg
961  ctacaactac gtagtgggga agaatatcgt tgacgcctcc aagttcgtga agggtttgcg
1021 cgtgacgacg gagtggatga acacgggtga cggcaagata ggcgatatta agaagggtgc
1081 cctgtatcta gtaacctgta ctcgtggagg tatcactgga gacagtgcct ccatttcatt
1141 cgaagttgta tgtgcctata cgcacgcgtg ttacttcaaa tccattggga ttcaataaat
1201 aaaatagtat tttattcatc tcatgtcatt cgattacaga tgctcggcta cgagcaaaga
1261 taaaccaaac tatgacatac aacacactca taaccaaaac atcgaaaaaa gaaatacaag
1321 gggcgagatc acacaatttt agaaaccgta gccgtccgcg ctaggacagt cactgcgaag
1381 cagtgacatt ttcgccgaag gcgaagaatg attcaccctc atacatataa tgtatcacag
1441 cgttagagta catgtaatcc gactgttcag gagtcatatc cttgagccaa tcttcgtctg
1501 ggttaactaa aatgatgcaa ggtataccac cccgtatcat ttttcgcttc ccgtacttag
1561 gattgacggt gaagtcacgc tgagccccga cgaagcactt ccagtttggc gtgaacttga
1621 atggaatgtc gtcaattatg ttgtactttg cgttgacgtc ataggtcgtg aaatcaacta
1681 ggccgttgta gtagttgtgg atccctagag atcttgccca ggaagtcttt cctgttcttg
1741 tcggaccgca gatgtagatg gacttatgcc gtcccggtga ctcctggaat aatcgtccat
1801 ccactctaaa tcagttacgg ccttatccgc aggagttgaa gtacaaagga tgtatgattc
1861 gaggcttacg gagtagagat gttcattttt ccagctttca atggtctcat gacacatgag
1921 ggactcgatg ggaaactcag gtgtgtaagt gctaactggg tctgggaata ggtggcgtgc
1981 agtgtattcg aagtctttca gacggataga ccattcaaac ggaaaacgat ggcagaccat
2041 gctgagaaat tcctctctcg aggtactcga ctcaatgatc tgtttcatat ccgcgtctcg
2101 gtctttacga cccggagtgg taactgctac gaatgttccc cactcagccg tgttgacatc
2161 ggagtcaacc tccttcatga tgtaatcacg aacttggttg cagtctttgg cagcttgaat
2221 gttaggatga aaaaatgaaa atggtgatgt gttcatacca atgttgagag cattgggatt
2281 ggtgatggaa gcacgaagct tgttttgcac gagtacgtgc agatgtggtg atccatcttc
2341 gtggagttcc ctaactgcag ctatgtacag aggttcatat ttggccaaga gagtgcgaag
2401 agagtccaag gcgtactgtg gctctaggat gcattgagga tatgttagga agaggtattt
2461 ggaatagaca cggaacctgg gtgcagatga agaggccata gtagcaagca gaagcccggc
2521 aggtccttag cgaaaaaacg gggtgtgctc ccgaactcta ctctctaccc tgcgtgggag
2581 tgtgcagaat tcacaccgat gggctcggtg tccacggttt aaatattgca ggtttaggtg
2641 ggaacgcggg accctgtctt ttcggcgcga aagcgacggg tggtcccgcg tgtggtttgt
2701 ggctcgggga cccgccacgc aggaatctaa tatt
```

171-443 Movement protein
415-1197 Coat protein
1198-1369 Rep gene
1717-2511 RepA gene
gacggataga ccattcaaacg WDV Rep-F
Gtgcgaagagagtccaag WDV Rep-R

Cggcttttcgt gagtgc, c cactgacatc tttacgatgcc navržené primery *dle Ripl et al.*,2009

Příloha č. 4 Ořezané sekvence s navrhnutými primery

```
KJ536128        TTTGAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATTGCAAACCATGCTGAGGAATTCCTC
AJ311031        TTTGAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATTGCAAACCATGCTGAGGAATTCCTC
KM079155        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
FM999833        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
AM296019        TTTCAGACGGCGGACCAGGCGGACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
FJ546193        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
JQ647458        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
FJ546181        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
AM921991        TTTCAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
AM922262        TTTGAGACGGATAGACCATTCAAACGGAAAACGATGGCAGACCATGCTGAGAAATTCCTC
                *** ******   *****  *  ************ *** ********** ********

KJ536128        AGCAGCGATGTAGAGGGGCTCATATTTGTTCAAGAGAGTGCGAAGTGAATCCAAGGCGTA
AJ311031        AGCAGCGATGTAGAGGGGCTCATATTTGTTCAAGAGAGTGCGAACTGAATCCAAGGCGTA
KM079155        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
FM999833        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
AM296019        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
FJ546193        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
JQ647458        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
FJ546181        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
AM921991        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
AM922262        TGCAGCTATGTACAGAGGTTCATATTTGGCCAAGAGAGTGCGAAGAGAGTCCAAGGCGTA
                 ***** ***** ** ** *********  *************** ** ***********
```

Námi použité primery dle Benkovics *et al.* 2010

Chyby v primerech