

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Detekce fytopatogenů jahodníku

Bakalářská práce

Barbora Michálková

Školitelka: Ing. Jana Fránová, Ph.D.

České Budějovice 2019

Michálková, B., 2019: Detekce fytopatogenů jahodníku [Detection of strawberry phytopathogens. Bc. Thesis, in Czech.] – 33 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Strawberries were tested for presence of selected phytopathogens (*Agrobacterium*, *Rhodococcus*, phytoplasmas, *Strawberry mild yellow-edge virus*, *Strawberry mottle virus*, *Strawberry polerovirus 1*, *Strawberry crinkle virus* and *Strawberry cytorhabdovirus 1*) by the Polymerase Chain Reaction. At the same time was researched the transmission of mentioned phytopathogens by grafting. The DNA of the strawberries with positive results was sequenced.

Tato práce byla financována z níže zmíněných grantů od NAZV MZE ČR.

Grant č. QJ1610365 „Výzkum a využití perspektivních technologických postupů v systémech ekologické a integrované produkce jahod“, 2016-2018

Grant č. QK1920245 „Výzkum rozšíření biologických vlastností a škodlivosti virů identifikovaných v rostlinách jahodníku pomocí nejnovějších diagnostických metod (NGS, PCR) jako podklad pro přípravu legislativy, 2019-2021

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným stanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 17. 4. 2019

.....
Barbora Michálková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Ing. Janě Fránové, Ph.D. za odborné vedení, dobré rady a vstřícnost. Dále pak Ing. Tomáši Kocábkovi, Ph.D. za pomoc při detekci *Agrobacteria* a v neposlední řadě laborantce Mgr. Olze Baudysové za ochotnou pomoc při výzkumu a přátelskou atmosféru na pracovišti. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za umožnění studia a podporu v jeho průběhu.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	3
3. Teorie	4
3.1. Detekované fytopatogeny	4
3.1.1. Strawberry crinkle virus	4
3.1.2. Strawberry mild yellow-edge virus	4
3.1.3. Strawberry mottle virus	4
3.1.4. Strawberry polerovirus 1.....	5
3.1.5. Strawberry cytorhabdovirus 1.....	5
3.1.6. Agrobacterium	5
3.1.7. Rhodococcus	6
3.2. Aplikované metody	6
3.2.1. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)	6
3.2.2. Gelová elektroforéza	6
3.2.3. Sekvenování	7
4. Materiály a metody	8
4.1. Biologický materiál	8
4.2. Izolace DNA pomocí kitu DNeasy Plant Mini - QIAGEN.....	9
4.3. Izolace RNA.....	10
4.3.1. Izolace RNA pomocí kitu RNeasy Plant Mini – QIAGEN	10
4.3.2. Izolace RNA pomocí kitu Ribospin Plant – GeneAll	11
4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	12
4.4.1. Reakční směsi pro PCR	13
4.4.2. Primery použité pro PCR	13

4.4.3. Sekvence použitých primerů	14
4.4.4. Amplifikační programy použité pro PCR	14
4.5. Přepis RNA na cDNA	16
4.6. Sekvenování	17
4.7. Přečištění DNA z PCR produktu použitím kitu QIAquick	17
4.8. Přečištění DNA z agarózového gelu použitím kitu QIAquick	18
4.9. Roubování	19
5. Výsledky.....	19
6. Diskuze	21
7. Závěr	22
8. Použitá literatura.....	24
9. Přílohy	26

1. Úvod

Jahodník (rod *Fragaria*) je krytosemenná dvouděložná rostlina patřící do čeledi *Rosaceae*. Jedná se o vytrvalou bylinu. Rod *Fragaria* zahrnuje asi 20 druhů. Nejběžnější a nejčastěji pěstovaný v zemědělství je jahodník velkoplodý (*Fragaria annanassa*). Tento druh pochází z Jižní Ameriky a opakovaným křížením a šlechtěním se z něj stala rostlina tvořící plody, jaké známe z obchodů. Druhým, též poměrně známým druhem je jahodník obecný (*Fragaria vesca*), který se vyskytuje příležitostně na zahradách. Její odrůda *F. vesca Alpine* se velmi často používá v laboratořích jako indikační rostlina pro detekci fytopatogenů. (Maas, 1998)

Jahodníky mají široký areál výskytu v mírném a subtropickém pásu, přičemž každý kultivar je trochu jinak adaptován na své prostředí. Rostlina je ovlivňována hlavně fotoperiodou, teplotou, kvalitou půdy a kolísáním vlhkosti. V závislosti na fotoperiodě se kultivary dělí do tří skupin. První z nich jsou závislé na délce dne a plodí jednou za rok. Druhá skupina se vyskytuje v oblastech, kde jsou dny delší a sklízí se 2-3x do roka. A do poslední skupiny patří kultivary nezávislé na fotoperiodě plodící kontinuálně. Všechny tři skupiny jsou ale vždy zároveň ovlivňovány podmínkami prostředí. Velký vliv na tzv. fitness rostliny mají samozřejmě také škůdci a nemoci. (Maas, 1998)

Zde se dostáváme k důležitosti detekování fytopatogenů, a tedy k podstatě celé předkládané práce. Neboť správné rozpoznání původce nemoci může vést k vývoji účinné léčby nebo třeba k vyšlechtění kultivaru rezistentního vůči danému fytopatogenu. Celý tento proces má velký význam v zemědělství, jelikož jeden virus přenášený například mšicemi se může rozšířit i na celá jahodová pole a následně velmi negativně ovlivnit úrodu. Dost častým symptomem mnoha virových onemocnění bývá totiž poškození plodů nebo snižování výnosnosti rostliny.

Rostlinné viry jsou velice početnou skupinou malých nebuněčných organismů, přičemž mnoho kmenů ještě vůbec nebylo popsáno. (Maas, 1998) Jedná se o tzv. vnitrobuněčné parazity, neboť k replikaci své genetické informace potřebují vhodnou hostitelskou buňku. Replikace je následně závislá na mechanismu syntézy proteinů hostitele. Mají jednu nebo více molekul nukleových kyselin uzavřených obvykle v ochranném obalu (kapsidě) tvořeném proteiny nebo lipoproteiny. Jejich DNA či RNA je jedno- nebo dvouvláknová. (Hull, 2009) Charakteristické pro viry je, že jsou přenosné. Rostlinné viry jsou přenášeny hmyzem nebo prostřednictvím hlístů. Mezi nejvýznamnější viry napadající jahodníky patří *Strawberry crinkle virus*, *Strawberry mottle virus*, *Strawberry mild yellow-edge virus* a *Strawberry vein banding virus*. Poměrně často se vyskytují v komplexech a jejich účinky

bývají ničivé. Kromě zakrslosti a nízkého výtěžku, což nejsou moc výrazné symptomy, způsobují často také distorze rostlinných částí. Prozatím neexistuje žádná léčba, ale je možno vyšlechtit kultivary rezistentní vůči konkrétním virům nebo funguje použití pesticidů. (Maas, 1998)

Bakteriální onemocnění se u jahodníků vyskytují pouze tři, přičemž pouze první dvě jsou způsobovány pouze bakteriemi. Mezi jejich hlavní příznaky patří skvrnitost listů a vadnutí rostliny. Třetí nemoc je zapříčiněna bakterií ve spolupráci ještě s jiným fytopatogenem. (Maas, 1998)

Onemocnění způsobená fytoplazmami byla v historii dlouho přičítána virům. K vyčlenění a popisu došlo až v roce 1994. Původně byly označovány za mykoplazmám podobné organismy, neboť se dlouho nedařilo je izolovat, kultivovat a úspěšně taxonomicky klasifikovat. Klíčový pro klasifikaci fytoplazem byl objev rodu *Spiroplasma*. Jedná se o fytoplazmu šroubovitého tvaru, kterou je možné kultivovat na umělém médiu. Nyní tedy víme, že jde o prokaryota patřící do třídy Mollicutes. Důležitým znakem je absence buněčné stěny. (Kůdela a kol., 2002)

2. Cíl práce

Cílem předkládané práce bylo izolovat DNA či RNA z rostlinného materiálu a pomocí polymerázové řetězové reakce detekovat přítomnost jednotlivých fytopatogenů (*Agrobacterium*, *Rhodococcus*, fytoplazmy, *Strawberry mild yellow-edge virus*, *Strawberry mottle virus*, *Strawberry polerovirus 1*, *Strawberry crinkle virus* a *Strawberry cytorhabdovirus 1*). Dále bylo potřeba ověřit výsledky PCR přečištěním vzorků a osekvenováním. Zároveň byla zjišťována možnost přenosu nového fytopatogenu roubováním.

3. Teorie

3.1. Detekované fytopatogeny

3.1.1. Strawberry crinkle virus

SCV je jedním z virů napadajících jahodníky s nejničivějšími účinky. Způsobuje hlavně zmenšování plodů a redukuje produkci, ale projevy jsou různé. Mezi další patří např. světlé skvrny na listech, deformace a zmenšování listů, zkrácené řapíky, nepoměr velikosti lístků, kroucení a zvrásnění listů nebo třeba červené až nekrotické léze na řapíku způsobující ohyby řapíku a léze na výhoncích. Nebo se symptomy nemusí projevit vůbec. Obvykle se objevují 14-21 dnů od přenosu. Všechny druhy jahodníků jsou náchylné k nákaze tímto virem. K přenosu dochází ustáleným stylem prostřednictvím mšic rodu *Chaetosiphon*. Po nakažení mšice zůstává virus nejprve 10-19 dní v latentní fázi, poté přežívá až do konce života mšice. Viry mají podobu baciloformních částic a nuklovou kyselinou je zde RNA. Při výzkumu zaměřeném na SCV byly zatím identifikovány čtyři virové proteiny. (Maas, 1998)

3.1.2. Strawberry mild yellow-edge virus

SMYEV byl dlouho považován za luteovirus, neboť také způsobuje žloutnutí listů hostitelské rostliny. Později bylo zjištěno, že tyto projevy způsobuje jeho přítomnost v komplexu s luteovirem. Luteoviry totiž napomáhají přenosu, samy jsou možná bez příznaků. SMYEV se také často vyskytuje současně s SCV nebo SMOV. Příznaky onemocnění jsou spíše mírné a objevují se obvykle po 8-10 dnech od přenosu, ale to být až 15 týdnů nebo se nemusí objevit vůbec. Nejčastějšími symptomy bývají epinastie lístků, bledé fleky v oblasti listové žilnatiny vedoucí až k nekróze listu, červenání a zmíněné žloutnutí listů. Příznaky a míra jejich projevu záleží na virovém kmeni a rostlinném kultivaru. U citlivých indikačních rostlin je může objevit zakrslost, kroucení listů a zmenšení plodů. Přenos je ustálený cyklický, zajišťován mšicemi. Nakažení mšice probíhá přes noc nebo maximálně několik dní a virus v ní zůstává po celý život (nebo alespoň po většinu). Vůči tomuto viru neexistují žádné rezistentní kultivary. (Maas, 1998)

3.1.3. Strawberry mottle virus

SMOV je nejběžnějším virem na jahodnicích s velice širokým areálem výskytu a obsahuje nesčetně kmenů. Většinou se neprojeví žádné příznaky, ale může dojít ke snížení výnosu až o 30%. Pokud se vyskytuje v komplexu s dalším virem, dochází ke snižování výnosů později. Jestliže se přece jen nějaké příznaky projeví, dochází k tomu 7-10 dní po nákaze.

„Mottle“ znamená skvrnitost, což je jeden z hlavních symptomů. Objevuje se na listech, a to v různé míře, obvykle vytváří mozaiku. Mezi další příznaky patří zakrslost, kroucení až smrt. Je možné, že symptomy způsobuje více virů, ale není to potvrzeno. *SMOV* je rovněž přenášen mšicemi rodu *Chaetosiphon* a také druhem *Aphis gossypii* a v případě, že je jejich populace dostatečně velká, dokáže na poli přežít i několik let. Přenos na mšici totiž trvá pár minut a virus v ní zůstane jen několik hodin. Z tohoto důvodu je vhodnou ochranou geografická izolace, neboť nakažená mšice nestihne během několika málo hodin překonat větší vzdálenost. Dále se používají též pesticidy. Pokusy o izolaci viru nebyly zatím úspěšné, tudíž nebylo možno vytvořit antisérum či syntetizovat cDNA. (Maas, 1998)

3.1.4. Strawberry polerovirus 1

Virus patří k rodu *Polerovirus*, skupina *Luteoviridae*. (Xiang a kol., 2014) Prvně detekován v letech 2013 a 2014 ve východní Kanadě. Pravděpodobně se jedná o luteovirus napomáhající přenosu onemocnění mild yellow. Z 28 vzorků infikovaných *SMYEV* se ve 24 vyskytoval v komplexu právě s *SPVI*. *SPVI* sám o sobě pravděpodobně nezpůsobuje žádné příznaky. (Thekke-Veetil a Tzanetakis, 2016)

3.1.5. Strawberry cytorhabdovirus 1

Jedná se o nově objevený virus rodu *Cytorhabdovirus*, patřící do skupiny *Rhabdoviridae*. Příznaky jsou podobné jako u *SCV*, jenž je zástupcem stejné skupiny. Jde o světlou mozaiku na listech, kroucení a zvrásnění lístků a nepoměr v jejich velikosti.

3.1.6. Agrobacterium

Jedná se o gramnegativní nesporulující bakterii s 1-6 peritrichálními bičíky. Tvoří krátké tyčinky vyskytující se nejčastěji samostatně nebo v páru. Jsou aerobní, mají aerobně respirační metabolismus. Kolonie jsou okrouhlé, vypouklé, nepigmentované nebo světle béžové. *Agrobacterium* se vyskytuje v půdě, ve vodě nebo na povrchu kořenů rostlin. Do rostliny proniká přes místo poranění. Napadá typicky *Rosaceae*, konkrétně maliník, ostružiník a růže. Transformuje a zvětšuje buňky a nutí je rychleji se dělit. Bakterie jsou buď rhizogenní (způsobují nárůst kořenů) nebo tumorogenní (nádorovitost). Vnášení vlastních genů do rostlinného genomu zajišťuje velký plazmid. Pokud ho buňka nemá, není patogenní. Ovšem díky plazmidu je *Agrobacterium* nepostradatelným nástrojem genového inženýrství. Prostřednictvím zmíněného plazmidu jsou vnášeny klonované geny do genomu rostliny. (Kúdela a kol., 2002)

3.1.7. Rhodococcus

Jde o grampozitivní nesporeující kyselinovzdornou bakterii. Tvoří tyčinky, větvená vlákna nebo koky. Kolonie jsou malé, vypouklé, mukoidní a mají světle oranžovou barvu. *Rhodococcus* se vyskytuje v půdě a ve vodě a má široký okruh hostitelů, hlavně na severní polokouli. Fytopatogenní je pouze druh *Rhodococcus fascians* způsobující fasciaci (svazčitost), zmnožení pupenů, znetvoření listů a zkrácení a deformování stonků. (Kůdela a kol., 2002)

3.2. Aplikované metody

3.2.1. Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

Metoda PCR byla objevena roku 1985 Kary B. Mullisem. Respektive byl prvním, kdo ji byl schopen realizovat. Jednoduše řečeno se jedná o získání specifické sekvence DNA. Přesněji o opakovanou enzymovou syntézu nových řetězců vybraných úseků dvouvláknové DNA. To ovšem neznamená, že by nebylo možné amplifikovat rovněž vybrané úseky jednovláknové RNA. I to je samozřejmě možné, ale je nutné nejprve syntetizovat cDNA podle templátové mRNA, která následně jakoby nahrazuje druhé vlákno. PCR probíhá opakovaně ve třech následujících krocích.

První fáze se nazývá denaturace. Jedná se o rozštěpení dvouvláknové DNA na dvě samostatná vlákna. Dochází k ní zvýšením teploty, obvykle na 94-95°C. Vzniknou tak dvě templátová vlákna připravená pro druhou fázi.

Ve druhé fázi nazývané annealing dochází k nasedání primerů na konkrétní místa denaturovaného vlákna. Primery jsou krátké úseky DNA či RNA a nasedají na počáteční místa následné replikace. Každý z dvojice primerů nasedá na jedno z protilehlých vláken, 3' konci (OH- skupinami) proti sobě.

Třetí fáze zahrnuje syntézu druhého vlákna. Proces probíhá vždy od 5' ke 3' konci, na obou řetězcích protisměrně. Je zprostředkován DNA-polymerázou, díky níž jsou na 3' konec postupně přidávány volné nukleotidy. Jelikož je DNA-polymeráza dostatečně odolná, aby nedenaturovala při teplotách okolo 94°C, je umožněno cyklické opakování zmíněného procesu a vybraný úsek nukleové kyseliny se exponenciálně množí až do počtu miliard kopií. PCR je tedy možno označit jako způsob klonování. (Šmarda a kol., 2005)

3.2.2. Gelová elektroforéza

Jedná se o separační metodu fungující na principu různých velikostí nabitých molekul separovaných látek. Jelikož elektroforetická pohyblivost molekul je nepřímo úměrná jejich

velikosti. To znamená, že čím jsou molekuly menší, tím dále za stanovený čas projdou gelem. Separace probíhá za stejnosměrného elektrického proudu, kdy konkrétně při separaci DNA postupují záporně nabitě fosfátové skupiny skrze porézní gel směrem ke kladné elektrodě (anodě). Při této separaci se používá agarózový gel o koncentraci odpovídající velikosti procházejících molekul. K vyhodnocení výsledků se používá tzv. marker, který je rovněž aplikován na gel a obsahuje různé molekuly o známé velikosti. Tudíž po vizualizaci UV světlem vytvoří na gelu sérii proužků odpovídajících určitým velikostem a podle toho lze určit velikost molekul testovaných vzorků. Intenzita proužků zároveň odráží koncentraci nukleových kyselin ve vzorku. (Šmarda a kol., 2005)

3.2.3. Sekvenování

Sekvenování znamená stanovení primární struktury, tedy pořadí jednotlivých nukleotidů v molekule DNA/RNA. Existují následující dvě metody sekvenování.

První z nich se nazývá Maxamovo-Gilbertovo sekvenování. Dochází při něm k rozštěpení řetězce vždy v místě určité báze. To dá za vznik mnoha krátkým řetězcům, jejichž délka odpovídá vzdálenosti daných bází. Následuje elektroforéza, při níž se nanesou na gel čtyři vzorky vedle sebe ve speciálním pořadí. Pořadí bází se nakonec stanoví podle vzájemných poloh proužků v řadách.

Druhou metodou je enzymová metoda nazývaná též Sangerovo sekvenování. Jde o metodu dnes nejpoužívanější. Vzorek je použit jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky za přítomnosti DNA-polymerázy. Do reakční směsi je přidán vždy jeden ze čtyř ddNTP (2', 3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát), který funguje jako koncový inhibitor syntézy, neboť mu na 3' konci chybí OH- skupina. Díky němu je syntéza ukončena vždy v místě odpovídající báze. Poměr dNTP a ddNTP rozhoduje o délce syntetizovaných řetězců. Na závěr jsou vytvořeny také čtyři oddělené vzorce, přičemž každá reakce stanovuje relativní pozice specifické báze na konci analyzovaného řetězce. Pořadí nukleotidů je stejně jako u přechodí metody odečteno podle pořadí proužků v řadách. (Šmarda a kol., 2005)

4. Materiály a metody

4.1. Biologický materiál

V předkládané práci je zaznamenáno testování celkem 28 jahodníků (rod *Fragaria*). U prvních tří rostlin druhu *Fragaria vesca* byl důvodem k testování výskyt unikátních novotvarů v místě styku podzemní a nadzemní části rostliny. Následně byly testovány tři původní rostliny druhu *Fragaria annanassa*, z nichž již zmíněné roubované rostliny vznikly. Na původních rostlinách nebyly do té doby pozorovány žádné příznaky infekce, ale bylo potřeba zjistit, zda přesto nedošlo k nakažení roubováním.

Dále bylo testováno 12 roubovaných rostlin druhu *Fragaria vesca*, odrůda *Alpine*, díky nimž se měla potvrdit hypotéza o přenosu fytopatogenů roubováním. Původní rostliny druhu *Fragaria annanassa*, z nichž byly rouby získány, byly totiž prokazatelně infekční, dokonce se u nich prokázala přítomnost i více fytopatogenů zároveň. U některých rostlin roubovaných se pak skutečně po necelém měsíci začaly objevovat příznaky, jež obvykle způsobují fytopatogeny, jejichž přítomnost byla prokázána u původních rostlin. Šlo např. o kroucení listů, světlou mozaiku na listech, epinastii a červenání.

Dalších 5 indikačních rostlin bylo opatřeno rouby stejného původu jako rostliny s novotvarou. Šlo o pokus, zda se na roubovaných rostlinách projeví nákaza ve větší míře a bude možné detekovat fytopatogeny snáze.

Všechny výše zmíněné rostliny pocházely z nejrůznějších lokalit ČR.

Posledních 5 vzorků druhu *Fragaria annanassa* pocházelo z běžného venkovního záhonu v jihočeské obci Lhenice. Šlo o sazenice jahodníků zakoupené v zahradnictví. U těchto rostlin byly rovněž pozorovány příznaky, jež napovídaly přítomnosti fytopatogenu. Byly patrné deformace, kroucení listů a epinastie.

DNA byla v prvních třech případech izolována ze zmíněných novotvarů, u ostatních rostlin šlo až na jednu výjimku o izolaci z listu. U oné výjimky byla zároveň provedena izolace z listu i z části kořene rostliny. Důvodem byla domněnka možných lepších výsledků izolace. Úspěšnost izolace byla vyhodnocována pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, který je schopen určit koncentraci vyizolované DNA na základě absorbance (tzn. pohlcování světla různých vlnových délek) vzorku.

Vzorky izolované DNA byly postupně podrobeny PCR vždy s příslušnými primery odpovídajícími hledanému fytopatogenu. Vyhodnocení probíhalo formou elektroforézy,

načež byly vzorky se slibně vypadajícími výsledky ještě odeslány k osekvenování, aby bylo možno bezpečně určit přítomnost fytopatogenu podle pořadí nukleotidů.

4.2. Izolace DNA pomocí kitu DNeasy Plant Mini - QIAGEN

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů neuvedeno) s drobnými úpravami ze strany školitelky
- všechny centrifugační kroky byly prováděny v nechlazené stolní centrifuze Mini Spin plus Eppendorf
- vzorky byly po celou dobu izolace uchovávány na ledu (pokud výrobce v pracovním postupu neuvedl jinak)
- vzorky byly promíchávány pomocí MS2 Minishakeru MANEKO a následně vždy zvortexovány
- pro inkubaci vzorků při vyšší než pokojové teplotě byl použit termoblok Labnet AccuBlock (Digital Dry Bath)
- rostlinná tkáň (100 mg) byla rozdrčena v třecí misce v tekutém N₂ a následně byl homogenát převeden do 1,5 ml zkumavky
- k vzorku bylo přidáno 400 µl pufru AP1 a 4 µl RNase A a obsah zkumavky byl promíchán
- vzorek byl inkubován 10 min při teplotě 65°C, přičemž zkumavky byly během inkubace 3x převráceny
- k lyzátu bylo přidáno 130 µl pufru P3, obsah zkumavky byl promíchán a inkubován 5 min na ledu
- lyzát byl pipetován na QIAshredder Mini spin kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce a následně centrifugován 2 min při 14.000 rpm
- proteklá frakce byla přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky, byla přidána 1,5 objemu pufru AW1/E (s přidaným 96% ethanolem) a obsah zkumavky byl promíchán pipetováním
- směs byla pipetována na DNeasy Mini spin kolonku ve 2 ml sběrné zkumavce a centrifugována 75 s při 8.000 rpm
- kolonka byla umístěna do čisté 2 ml zkumavky, bylo přidáno 500 µl pufru AW2 (s přidaným 96% ethanolem) a centrifugováno 1 min při 8.000 rpm
- po odstranění proteklé frakce bylo přidáno opět 500 µl AW2 a centrifugováno 2 min při 14.000 rpm (kvůli vysušení membrány)

- kolonka byla umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo přidáno 40 µl pufru AE (kvůli promytí membrány), vzorek byl inkubován 5 min při pokojové teplotě a následně centrifugován 75 s při 8.000 rpm
- promytí kolonky bylo zopakováno ještě jednou
- vzorky izolované DNA byly skladovány při -20°C

4.3. Izolace RNA

4.3.1. Izolace RNA pomocí kitu RNeasy Plant Mini – QIAGEN

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů neuvedeno) s drobnými úpravami ze strany školitelky
- všechny centrifugační kroky byly prováděny v nechlazené stolní centrifuze Mini Spin plus Eppendorf
- vzorky byly po celou dobu izolace uchovávány na ledu (pokud výrobce v pracovním postupu neuvedl jinak)
- vzorky byly promíchávány pomocí MS2 Minishakeru MANEKO a následně vždy zvortexovány
- pro inkubaci vzorků při vyšší než pokojové teplotě byl použit termoblok Labnet AccuBlock (Digital Dry Bath)
- rostlinná tkáň (100 mg) byla rozdrčena v třecí misce v tekutém N₂ a následně byl homogenát převeden do 2 ml zkumavky
- k vzorku bylo přidáno 500 µl pufru RLT, směs byla promíchána a za občasného promíchání inkubována 3 min při 56°C
- lyzát byl přenesen do QIAshredder spin kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce a centrifugován 2 min při 14.500 rpm
- proteklá část byla přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky, byla přidána ½ objemu 96% ethanolu a směs byla promíchána pipetováním
- vzorek byl přenesen do RNeasy kolonky v 2 ml sběrné zkumavce, centrifugován 15 s při 12.000 rpm a proteklá část byla vylita
- do kolonky bylo přidáno 700 µl pufru RW1 (kvůli promytí membrány), centrifugováno 15 s při 12.000 rpm a proteklá část byla vylita
- do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru RPE (s přidáním 96% ethanolu), centrifugováno 15 s při 12.000 rpm (kvůli promytí membrány) a proteklá část byla odstraněna

- opět bylo přidáno 500 µl pufru RPE a centrifugováno 2 min při 12.000 rpm (kvůli promytí a vysušení membrány)
- RNeasy kolonka byla umístěna do čisté 2 ml zkumavky a centrifugována 1 min při 14.500 rpm
- kolonka byla umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo přidáno 50 µl RNeasy-free vody přímo na membránu a po inkubaci 1,5 min při pokojové teplotě byl vzorek centrifugován 1 min při 14.500 rpm (kvůli vymytí RNA)
- promytí kolonky bylo zopakováno ještě jednou
- vzorky izolované DNA byly skladovány při -20°C

4.3.2. Izolace RNA pomocí kitu Ribospin Plant – GeneAll

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů neuvedeno) s drobnými úpravami ze strany školitelky
- všechny centrifugační kroky byly prováděny v nechlazené stolní centrifuze Mini Spin plus Eppendorf při 14.500 rpm
- vzorky byly po celou dobu izolace uchovávány na ledu (pokud výrobce v pracovním postupu neuvedl jinak)
- vzorky byly promíchávány pomocí MS2 Minishakeru MANEKO a následně vždy zvortexovány
- pro inkubaci vzorků při vyšší než pokojové teplotě byl použit termoblok Labnet AccuBlock Digital Dry Bath
- rostlinná tkáň (100 mg) byla rozdrčena v třecí misce v tekutém N₂ a následně byl homogenát převeden do 2 ml zkumavky
- k vzorku bylo přidáno 450 µl pufru RPL, směs byla promíchána a 3 min inkubována při pokojové teplotě
- lyzát byl přenesen na EzPureTM kolonku a centrifugován 2 min
- proteklý lyzát byl přenesen do čisté 1,5 ml zkumavky, byl přidán 1 objem 96% ethanolu a roztok byl promíchán otáčením zkumavky
- směs byla přenesena na Mini Spin kolonku (typ W) umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce, centrifugována 1 min a proteklá část byla vylita
- na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru RBW, centrifugováno 1 min a proteklá část byla odstraněna

- v čisté 1,5 ml zkumavce byl připraven premix reakční směsi DNase I, tzn. bylo smícháno 70 µl pufru DRB a 2 µl DNase I
- do středu kolonky bylo nanášeno 70 µl DNase I reakční směsi a inkubováno 10 min při pokojové teplotě
- na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru RBW a inkubováno 2 min při pokojové teplotě (pufr RBW inaktivuje DNase I)
- vzorek byl centrifugován 1 min a proteklá část byla odstraněna
- na kolonku bylo přidáno 500 µl pufru RNW, centrifugováno 1 min a proteklá část byla vylita
 - tento krok se dvakrát opakoval
- vzorek byl znovu 1 min centrifugován a poté byla kolonka vložena do čisté 1,5 ml zkumavky
- do středu kolonky bylo nanášeno 45 µl RNase-free vody, inkubováno 1 min při pokojové teplotě a centrifugováno 2 min
- vzorky izolované DNA byly skladovány při -20°C

4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci fytopatogenů byly použity univerzální specifické primery vybrané vždy podle konkrétního viru, bakterie či fytoplazmy. Pro přesnější určení byla v některých případech použita metoda nested PCR, při které byla aplikována dvojice tzv. vnitřních primerů zaměřených na kratší úsek DNA. U této metody byla použita amplifikovaná DNA z předešlé direct PCR ředěná vodou v poměru 1:29. Při každé PCR (direct i nested) byla použita tzv. negativní kontrola, tedy vzorek připravovaný stejně jako ostatní, ale templátová DNA byla nahrazena ultračistou vodou. Negativní kontrola slouží jako důkaz, že vzorky nebyly kontaminovány. Při testování vzorků na *Agrobacterium* byla použita i tzv. pozitivní kontrola, a to konkrétně izolovaná DNA bakterie *Agrobacterium rubi*. Podle hledaného fytopatogenu byl vždy na cycleru zvolen specifický program pro PCR.

Výsledky PCR byly zjišťovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Gel byl připravován pro 17 vzorků z 0,35 g agarózy, 40 ml pufru 1x TBE a 1µl barviva GelRed (barvivo přidáno až po mírném zchladnutí směsi, aby nedošlo k denaturaci). Po ztuhnutí gelu byly nanášeny vzorky po 6 µl smíchaných s 3,5 µl nanášecího pufru. Nanášecí pufr s obsahem bromfenylové modři slouží ke zviditelnění vzorků při elektroforéze. Zároveň byl obvykle do první jamky v gelu nanášen 100 bp marker (0,4 µl + 3,5 µl nanášecího pufru; velikost fragmentů markeru: 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp), sloužící pro určení velikosti fragmentů vzorků. Vzorky byly následně separovány horizontální elektroforézou v pufru 1x TBE obvykle cca 20 minut (podle velikosti gelu

a počtu vzorků) při napětí 120 V. Vizualizace výsledků elektroforézy byla prováděna pomocí UV záření.

4.4.1. Reakční směsi pro PCR

a) pro detekci fytoplazem:

Master Mix (MM)	12,5 µl
H ₂ O	10,5 µl
primer forward	0,5 µl
primer reverse	0,5 µl
DNA	1 µl

b) pro detekci virů:

Master Mix (PCR MM, Top Bio)	10 µl
H ₂ O	8 µl
primer forward	0,5 µl
primer reverse	0,5 µl
cDNA	1 µl

4.4.2. Primery použité pro PCR

Při detekci následujících fytopatogenů byly použity specifické univerzální primery určené pro amplifikaci konkrétních úseků řetězce DNA či RNA klíčových pro stanovení přítomnosti daného fytopatogenu.

a) primery pro direct PCR:

- *Rhodococcus* JRERIGHT/JRELEFT
- *Agrobacterium* vir D2 F/R
- fytoplazmy P1A/P7A
- *SPV 1* POLERO 47Fw/SPV 1R
SPV 1F/1R
- *SMYEV* SMYEV f/r
- *SMoV* SMOV f/r
- *SCV* SCV F/R
- *SCRh 1* SCV 2f/7r

b) primery pro nested PCR:

- fytoplazmy P1A/P7A → R16 mF2/mR1
- *SPV 1* POLERO 47Fw/SPV 1R → SPV 1F/1R

4.4.3. Sekvence použitých primerů

JRERIGHT	5'-CGGGATCCATATCGAACCGCCCTC-3'	(Stange a kol., 1996)
JRELEFT	5'-GGGAATTCCGACCGTATCCAGTGT-3'	(Stange a kol., 1996)
vir D2 F	5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3'	(Haas a kol., 1995)
vir D2 R	5'-CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCCA-3'	(Haas a kol., 1995)
P1A	5'-ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC-3'	(Lee a kol., 2004)
P7A	5'-CCTTCATCGGCTCTTAGTGC-3'	(Lee a kol., 2004)
POLERO 47Fw	5'-GAGTGTCACCACCCCTCACTAC-3'	(Luciani a kol., 2016)
SPV 1F	5'-AGAGATCGCCGGATTCCGCAA-3'	(Thekke-Veetil a Tzanetakis, 2016)
SPV 1R	5'-TGACACGCTCGGTATTCACAAACAGT-3'	(Thekke-Veetil a Tzanetakis, 2016)
SMYEV f	5'-GTGTGCTCAATCCAGCCAG-3'	(Thompson a kol., 2003)
SMYEV r	5'-CATGGCACTCATTGGAGCTGGG-3'	(Thompson a kol., 2003)
SMOV f	5'-TAAGCGACCACGACTGTGACAAAG-3'	(Thompson a kol., 2003)
SMOV r	5'-TCTTGGGCTTGGACTGTACACCTG-3'	(Thompson a kol., 2003)
SCV F	5'-CATTGGTGGCAGACCCATCA-3'	(Thompson a kol., 2003)
SCV R	5'-TTCAGGACCTATTTGATGACA-3'	(Thompson a kol., 2003)
SCV 2f		(zatím nepublikováno)
SCV 7r		(zatím nepublikováno)
R16 mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	(Gundersen a Lee, 1996)
R16 mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC	(Gundersen a Lee, 1996)

4.4.4. Amplifikační programy použité pro PCR

Pro amplifikaci DNA byly použity různé programy vybrané vždy podle zvolených primerů. Jednotlivé programy se liší v teplotách, při nichž dochází k denaturaci, nasedání primerů (annealing) či k syntéze vláken (extension), zároveň ale také v délce časových intervalů, při nichž k těmto úkonům dochází nebo v počtu opakování cyklů. K amplifikaci byly použity celkem tři laboratorní cyclery, a to Labnet Multi Gene II, Bioer a Mini CyclersTM MJ RESEARCH. Po skončení amplifikace je v cycleru vždy ustálena teplota na 4°C.

- a) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů JRERIGHT/JRELEFT (*Rhodococcus*):
- | | | | |
|---------------------------|------------|------|-------|
| – počáteční denaturace | | 94°C | 2 min |
| – cyklus opakováný 33x: | denaturace | 94°C | 1 min |
| | annealing | 55°C | 1 min |
| | extension | 72°C | 40 s |
| – dosyntetizování řetězců | | 72°C | 5 min |

b) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů vir D2 F/R (*Agrobacterium*):

- počáteční denaturace 95°C 2 min
- cyklus opakovaný 36x:
 - denaturace 94°C 30 s
 - annealing 52°C 45 s
 - extension 72°C 1 min
- dosyntetizování řetězců 72°C 5 min

c) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů P1A/P7A (fytoplazmy):

- počáteční denaturace 94°C 11 min
- cyklus opakovaný 35x:
 - denaturace 94°C 1 min
 - annealing 55°C 2 min
 - extension 72°C 3 min
- dosyntetizování řetězců 72°C 7 min

d) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů P1A/P7A (fytoplazmy):

- počáteční denaturace 94°C 2 min
- cyklus opakovaný 35x:
 - denaturace 94°C 1 min
 - annealing 50°C 2 min
 - extension 72°C 3 min
- dosyntetizování řetězců 72°C 10 min

e) program použitý pro nested PCR s kombinací primerů P1A/P7A → R16 mF2/mR1 (fytoplazmy):

- počáteční denaturace 94°C 2 min
- cyklus opakovaný 35x:
 - denaturace 94°C 1 min
 - annealing 55°C 2 min
 - extension 72°C 3 min
- dosyntetizování řetězců 72°C 10 min

f) program použitý pro direct PCR s dvojicemi primerů POLERO 47Fw/SPV 1R; SPV 1F/1R a nested PCR s kombinací primerů POLERO 47Fw/SPV 1R → SPV 1F/1R (*SPV1*):

- počáteční denaturace 94°C 1 min
- cyklus opakovaný 35x:
 - denaturace 94°C 15 s
 - annealing 55°C 35 s
 - extension 72°C 35 s
- dosyntetizování řetězců 72°C 3 min

g) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů SMYEV f/r (*SMYEV*):

- počáteční denaturace 94°C 2 min
 - cyklus opakovaný 35x:

denaturace	94°C	1 min
annealing	55°C	40 s
extension	68°C	40 s
 - dosyntetizování řetězců 68°C 5 min
- h) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů SMOV f/r (*SMOV*):
- počáteční denaturace 94°C 1 min
 - cyklus opakovaný 35x:

denaturace	94°C	15 s
annealing	55°C	30 s
extension	72°C	30 s
 - dosyntetizování řetězců 72°C 2 min
- i) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů SCV 2f/7r (*SCRh1*):
- počáteční denaturace 94°C 2 min
 - cyklus opakovaný 35x:

denaturace	95°C	15 s
annealing	51°C	30 s
extension	72°C	40 s
 - dosyntetizování řetězců 72°C 10 min
- j) program použitý pro direct PCR s dvojicí primerů SCV F/R (*SCV*):
- počáteční denaturace 95°C 1 min
 - cyklus opakovaný 39x:

denaturace	95°C	15 s
annealing	51°C	30 s
extension	72°C	1 min
 - dosyntetizování řetězců 72°C 10 min

4.5. Přepis RNA na cDNA

Při PCR s použitím DNA dochází v prvním kroku k tzv. denaturaci, tedy roštěpení dvouvláknové šroubovice na dvě samostatná vlákna, aby bylo umožněno nasedání primerů a následná syntéza druhého vlákna za pomoci volných nukleotidů. Jelikož RNA je tvořena pouze jedním vláknem, je nutno podle ní syntetizovat cDNA, jakožto druhé vlákno. Tehdy může PCR probíhat obvyklým způsobem.

- reakční směs:

RNA	3 µl
Random primer	0,5 µl
10 mM dNTP Mix	0,5 µl
H ₂ O	3,5 µl

- reakční směs byla promíchána a inkubována v cycleru 5 min při 65°C
- směs byla krátce zchlazena na ledu a byly přidány 2 µl pufru First-Stana, 1 µl DTT a 0,5 µl reverzní transkriptázy (RT)
- směs byla promíchána a vrácena do cycleru
- vzorek byl podroben následujícímu programu:

37°C	2 min
25°C	10 min
37°C	50 min
70°C	10 min
- po skončení programu byl vzorek v cycleru zchlazen na 4°C, později uchováván při -20°C

4.6. Sekvenování

Vzorky, u nichž byla díky PCR a následné elektroforéze detekována přítomnost fytopatogenu, byly odesílány do německé laboratoře GATC-Biotech v Kostnici na osekvenování genomu, aby mohla být případná infekce potvrzena. Předtím bylo nutné vzorek zbavit primerů, polymerázy a solí. U většiny vzorků bylo aplikováno přečištění z PCR produktu, u některých byly přečištěny fragmenty vyříznuté z agarózového gelu. Důvodem bylo, že pro přečištění z PCR produktu musí být proužek na snímku gelu po elektroforéze čistý a zřetelný. Pokud tomu tak není, volí se přečištění z gelu.

Z takto přečištěné DNA pak byly připraveny dva vzorky na sekvenační reakci, každý s jedním z dvojice původních primerů. Vzorky odesílané k osekvenování byly míchány z 8,75 µl přečištěné DNA a 1,25 µl primeru.

Pro vyhodnocení získaných sekvencí byl používán počítačový program Vector NTI8. Získané sekvence byly porovnávány se sekvencemi z GenBank od BLASTn 2.2.16 service (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.7. Přečištění DNA z PCR produktu použitím kitu QIAquick

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů neuvedeno) s drobnými úpravami ze strany školitelky
- všechny centrifugační kroky byly prováděny v nechlazené stolní centrifuze Mini Spin plus Eppendorf při 14.000 rpm (pokud není uvedeno jinak)
- vzorky byly promíchávány pomocí MS2 Minishakeru MANEKO a následně vždy zvortexovány
- k jednomu objemu PCR vzorku bylo přidáno pět objemů pufru PB a promícháno

- vzorek byl aplikován na QIAquick kolonku umístěnou v 2ml sběrné zkumavce, centrifugován 1 min (kvůli navázání DNA) a následně byla proteklá část odstraněna
- na kolonku bylo přidáno 750 μ l pufru PE, centrifugováno 1 min (kvůli promytí) a proteklá část byla opět odstraněna
- vzorek byl centrifugován 2 min a poté byla kolonka umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky
- na střed membrány bylo přidáno 30 μ l elution pufru, kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a následně centrifugována 1 min při 13.000 rpm
- přečištěné vzorky DNA byly skladovány při -20°C

4.8. Přečištění DNA z agarózového gelu použitím kitu QIAquick

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů neuvedeno) s drobnými úpravami ze strany školitelky
- všechny centrifugační kroky byly prováděny v nechlazené stolní centrifuze Mini Spin plus Eppendorf při 14.000 rpm
- vzorky byly promíchávány pomocí MS2 Minishakeru MANEKO a následně vždy zvortexovány
- vážení bylo prováděno na laboratorních vahách KERN KB (max. 510 g, d = 0,01 g)
- při práci v komoře s UV zářením byly použity ochranné pomůcky
- fragmenty DNA byly vyříznuty z agarózového gelu sterilním skalpelem při osvětlení UV světlem
- plátky gelu byly zváženy ve zkumavce a k jednomu objemu gelu byly přidány tři objemy pufru QG (100 mg ~ 100 μ l)
- směs byla inkubována 10 min při 50°C , přičemž byla 3 min vortexována (kvůli rozpuštění gelu)
- k objemu vzorku byl přidán stejný objem isopropanolu a směs byla promíchána
- vzorek byl nanesen na QIAquick kolonku umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce, centrifugován 1 min a proteklá část byla odstraněna
- na kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru QG a centrifugováno 1 min
- na kolonku bylo dále přidáno 750 μ l pufru PE, centrifugováno 1 min (kvůli promytí membrány), proteklá frakce byla vylita a kolonka centrifugována znovu 1 min
- kolonka byla umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a do jejího středu bylo napipetováno 50 μ l pufru EB a centrifugováno 1 min

- na střed kolonky bylo přidáno 30 µl elution pufru, kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a následně centrifugována 1 min
- přečištěné vzorky DNA byly skladovány při teplotě -20°C

4.9. Roubování

Jedním z cílů předkládané práce bylo ověření teorie, že se fytopatogeny přenášejí roubováním. Tato teorie je sice u mnoha fytopatogenů už dávno potvrzena, ale nebylo tomu tak u nově objeveného cytorhabdoviru. Za tím účelem byly tedy z původních 8 rostlin druhu *Fragaria annanassa* vytvořeny rouby, jejichž prostřednictvím měla být infekce přenesena na indikační rostliny druhu *Fragaria vesca*, odrůda *Alpine*. Z každé původní rostliny vznikly dvě až tři nově naroubované, ale ne všechny rouby se uchytily. Celkem bylo získáno 17 roubovaných vzorků.

Postup roubování:

- z původní rostliny byl sterilní žiletkou odříznut jeden list (trojčetný)
- z listu byly odřezány postranní lístky tak, aby řapík prostředního lístku zůstal co nejdelší a byl seříznut do špičky
- následně byl z indikační rostliny odříznut list asi v půli řapíku a zbývající řapík byl rozpůlen podélně v délce cca 1,5 – 2 cm
- připravený roub byl vložen do žlábků v řapíku (tak, aby se cévní svazky napojily) a upevněn proužkem celofánu
- stejným způsobem byl vytvořen druhý roub
- ostatní listy indikační rostliny byly odstraněny
- rostlina byla zalita a přikryta celofánovým sáčkem

Indikační rostlina byla zakryta po dobu několika dní. Úspěšnost roubování byla dokázána, jestliže rouby v prvních dnech neuschly a později začaly vyrůstat nové listy.

5. Výsledky

Prvním krokem při detekci fytopatogenů u testovaných rostlin byla izolace nukleových kyselin. Z 28 vzorků byla u prvních šesti izolována DNA, u zbylých se jednalo o RNA. V případě prvních tří vzorků byla DNA izolována z neobvyklých novotvarů, jež se vytvořily na bázi stonku a listů, u všech ostatních šlo o izolaci DNA i RNA z listů (ideálně listy s příznaky). V jednom případě byla RNA izolována zároveň z listu i z kořene rostliny kvůli domnělé vyšší koncentraci RNA v izolátu. Kvalita izolátu byla vždy ověřena na NanoDropu,

kdy byla díky změřené absorbanci vzorku při různých vlnových délkách vypočítána koncentrace nukleových kyselin. Hodnoty koncentrací byly velice různé, ale všechny izoláty byly nakonec uznány jako vhodné pro další použití. Důležitým ukazatelem kvality u izolátu je kromě koncentrace také poměr absorbancí při 260 a 280 nm. V ideálním případě by měl poměr vycházet následovně: $A_{260}/A_{280} = 2$. I toto kritérium izoláty s menší odchylkou splňovaly.

Z izolátu DNA či RNA byla v dalším kroku namíchána reakční směs pro PCR. Dvojice primerů byla vždy vybrána podle sledovaného úseku řetězce. V případě detekce fytoplazem a *SPVI* bylo potřeba amplifikovat kratší část řetězce, a za tímto účelem byla po direct PCR provedena ještě nested PCR s tzv. vnitřními primery. Výsledky PCR byly zjišťovány prostřednictvím elektroforézy na 1% agarózovém gelu a vizualizovány následným osvětlením UV světlem. Měřítkem pro jednotlivé vzorky byl marker, aplikovaný rovněž do jamky v gelu, díky němuž bylo možno odečíst velikost fragmentů jednotlivých vzorků. Při každé elektroforéze byla rovněž alespoň do jedné jamky v gelu nanášena tzv. negativní kontrola, tedy vzorek, se kterým bylo pracováno naprosto stejně jako s ostatními, jen produkt PCR byl nahrazen vodou. Při detekci fytopatogenů *Agrobacterium* a *SCRh1* byla použita také tzv. pozitivní kontrola. Jedná se o vzorek DNA, který již byl testován a je prokazatelně pozitivní na přítomnost daného fytopatogenu. Obě kontroly slouží k ověření, zda nedošlo v průběhu laboratorní práce ke kontaminaci vzorků či chybě v postupu.

Ze snímku agarózového gelu po elektroforéze lze určit, zda je vzorek infikován daným fytopatogenem, ale ne se stoprocentní jistotou. Jak už bylo zmíněno, podle markeru byly přibližně zjištěny velikosti jednotlivých fragmentů ve vzorku, ale bylo potřeba bližší přezkoumání. Za tímto účelem byl izolát nukleové kyseliny přečištěn, aby mohl být následně odeslán k sekvencování zkoumaného úseku řetězce DNA či RNA. Z výsledného přesného pořadí nukleotidů bylo teprve možno se stoprocentní pravděpodobností určit, zda vzorek opravdu obsahuje genetickou informaci hledaného fytopatogenu. Na sekvencování bylo odesláno celkem 17 izolátů rostlinné DNA a RNA, tedy konkrétně 34 vzorků, neboť z každé přečištěné nukleové kyseliny je nutno namíchat dvě reakční směsi, každou s jedním primerem. U všech těchto vzorků byla prokázána přítomnost daného fytopatogenu, a to 8x šlo o nákazu *SPVI*, 5x o *SCRh1*, 3x o *SCV* a 1x o *SMYEV*. Z toho ve dvou případech šlo o současný výskyt více fytopatogenů, konkrétně u jedné rostliny zároveň *SPVI* a *SCRh1*, u druhé pak dokonce *SPVI*, *SCV* i *SMYEV*.

Dalším z cílů předkládané práce bylo ověření teorie o možnosti přenosu nákazy roubováním. Z původních 8 rostlin druhu *Fragaria annanassa*, které byly prokazatelně

infekční, bylo naroubováno 20 indikačních rostlin. U některých došlo v prvních dnech k uschnutí roubov, ale ve 12 případech se rouby uchytily. Zároveň bylo úspěšně naroubováno 5 nových indikačních rostlin, u kterých se testovalo, zda se znovu neobjeví zmiňované novotvary (či nějaké další příznaky). Použité rouby totiž měly stejný původ jako rouby rostlin, u nichž se novotvary vytvořily. Všechny 17 rostlin druhu *Fragaria vesca*, odrůda *Alpine* bylo následně testováno, aby se zjistilo, zda byl přenos úspěšný. Testy jednoznačně prokázaly možnost přenosu roubováním i u nově objeveného cytorhabdoviru.

K přenosu touto metodou ovšem nedojde vždy. Při roubování rostliny, která byla prokazatelně nositelem *SPVI*, *SCV* i *SMYEV*, došlo k přenosu všech těchto fytopatogenů na jednu indikační rostlinu, avšak druhá nebyla nakažena ani jedním. Ve druhém případě šlo o současnou infekci *SPVI* a *SCRh1*, přičemž přenos nastal u prvního v 75% pokusů, u druhého jen v 25%. U dalších dvou rostlin byla úspěšnost přenosu *SCRh1* a *SCV* 50%.

Co se týče přenosů fytopatogenů u 5 indikačních rostlin roubovaných ze stejných rostlin jako původní rostliny s novotvarů, byly také poměrně úspěšné. U prvních dvou rostlin byla úspěšnost přenosu *SPVI* 100%. U třetí rostliny se povedlo přenést *SPVI* a *SCRh1*, obojí v 50% případech.

Posledních 5 zkoumaných rostlin, které pocházely z obce Lhenice, bylo testováno stejně jako roubované rostliny na přítomnost *SPV 1*, *SCV*, *SCRh1*, *SMYEV* a *SMoV*. Po sekvenování se potvrdila přítomnost *SCV* u dvou rostlin, přičemž u jedné z nich zároveň *SCRh1*.

6. Diskuze

Prvním cílem překládané práce bylo zjistit příčinu vzniku novotvarů u tří rostlin druhu *Fragaria vesca*. Zároveň s těmito byly testovány i tři původní rostliny druhu *Fragaria annanassa*, z nichž byly zmíněné rostliny roubovány. Všechny 6 rostlin bylo postupně testováno na fytoplazmy, *Rhodococcus* a *Agrobacterium*, neboť takové byly odhadované příčiny vzniku novotvarů, ale bohužel ani v jednom případě úspěšně.

To vedlo k myšlence přenosu fytopatogenů roubováním s možnými výraznějšími projevy nákazy u indikačních rostlin a snazší detekcí. Zároveň bylo třeba otestovat možnosti přenosu nově objeveného cytorhabdoviru. Bylo tedy vybráno 8 rostlin druhu *Fragaria annanassa*, u nichž už byla prokázána přítomnost různých fytopatogenů (včetně *SCRh1*), a z nich bylo úspěšně naroubováno 12 indikačních rostlin. Současně bylo naroubováno dalších 5 rostlin rouby stejného původu jako ty, jež byly použity pro rostliny s novotvarů. Těchto 17

jahodníků druhu *Fragaria vesca*, odrůda *Alpine* bylo postupně testováno na přítomnost *SPV 1*, *SCV*, *SCRh1*, *SMoV* a *SMYEV*, neboť takové byly fytopatogeny detekované u původních rostlin. (Fytoplazmy a bakterie byly po předchozích testech vyloučeny.) Výsledky PCR a následného sekvenování ukázaly úspěšný přenos na 11 indikačních rostlin. Celkem 7 rostlin bylo nakaženo *SPV 1* a jedna z nich zároveň *SCRh1*. Na další dvě rostliny bylo rovněž přeneseno *SCRh1*, na jednu *SCV* a poslední jahodník získal roubováním *SPV 1*, *SCV* i *SMYEV*. U ostatních rostlin nebyla infekce prokázána. Úspěšnost přenosu fytopatogenů roubováním je tedy poměrně nevyzpytatelná, neboť v některých případech dojde k přenosu jen některých fytopatogenů, v jiných jen na některé indikační rostliny, anebo také k přenosu vůbec nedojde.

Posledním úkolem výzkumu k předkládané práci byla detekce fytopatogenů na 5 rostlinách pěstovaných v obci Lhenice. Šlo o rostliny nejasného původu zakoupené volně v zahradnictví. Bylo zjištěno, že jde o druh *Fragaria annanassa*. Sazenice byly vybrány, jelikož jevíly známky nákazy, tj. epinastie, deformace a kroucení listů. Cílem bylo zjistit, zda takto volně prodávané sazenice mohou být infikovány. Jako u roubovaných rostlin byla PCR zaměřena na *SPV 1*, *SCV*, *SCRh1*, *SMoV* a *SMYEV*. Následné sekvenování skutečně prokázalo infekci, a to u dvou z pěti rostlin. Jednalo se o *SCV* u jedné a *SCV* v kombinaci s *SCRh1* u druhé sazenice.

7. Závěr

Ze všech 28 testovaných jahodníků byly úspěšně izolovány nukleové kyseliny a s izoláty byla následně provedena série PCR s různými kombinacemi primerů. U vzorků se slibnými výsledky se pokračovalo přečištěním izolátů, aby mohly být osekvenovány. U prvních tří testovaných rostlin se bohužel nepodařilo určit příčinu vzniku novotvarů. Tyto rostliny, ani ty, z nichž byly zmíněné rostliny naroubované, nebyly pozitivní na přítomnost žádného z testovaných fytopatogenů, tj. fytoplazmy, *Rhodococcus* a *Agrobacterium*, přestože právě tyto fytopatogeny měli být údajně nejpravděpodobnější příčinou zmíněných příznaků. Původ vzniku novotvarů byl tedy nejspíše někde jinde a nejednalo se o fytopatogen. Podařilo se ovšem potvrdit hypotézu o přenosu nově objeveného cytorhabdoviru roubováním. Tato metoda přenosu ovšem není příliš spolehlivá. Přenos se podařil celkem u 11 rostlin ze 17 roubovaných, a ne ve všech případech došlo k současnému přenosu všech fytopatogenů. Dále byla potvrzena nákaza *SCV* a *SCRh1* u sazenic zakoupených v zahradnictví.

Ze všech testovaných fytopatogenů byly detekovány *Strawberry polerovirus 1*, *Strawberry crinkle virus*, *Strawberry cytorhabdovirus 1* a *Strawberry mild yellow-edge virus*. Přítomnost fytoplazem, bakterií *Agrobacterium* a *Rhodococcus* ani *Strawberry mottle viru* se u žádné rostliny prokázat nepodařila.

8. Použitá literatura

Gundersen D. E., Lee I.-M. 1996. Ultrasenzitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35 (3), pp. 144-151.

Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. 1995. Univesal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2879-2884.

Hull R. 2009. Comparative plant virology. *Second edition*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. ISBN 978-0-12-374154-7.

Kůdela V., Novacky A., Fucikovsky L. 2002. Rostlinolékařská bakteriologie. Academia. ISBN 80-200-0899-3.

Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S. F. 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‚*Candidatus Phytoplasma ulmi*‘ for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 337-347.

Luciani C. E., Celli M. G., Merino C., Perotto M. C., Pozzi E., Conci V. C. 2016. First Report of Strawberry polerovirus 1 in Argentina. *Plant Disease*, 100(7), p. 1510.

Maas J. L. 1998. Compendium of Starwberry Diseases. *Second edition*. APS Press. The American Phytopatological Society. ISBN 0-89053-194-9.

Stange R. R., Jeffares D., Young C., Scott D. B., Eason J. R., Jameson P. E. 1996. PCR amplification of the *fas-1* gene for the detection of virulent strains of *Rhodococcus fascians*. *Plant Pathology* 45, 407-417.

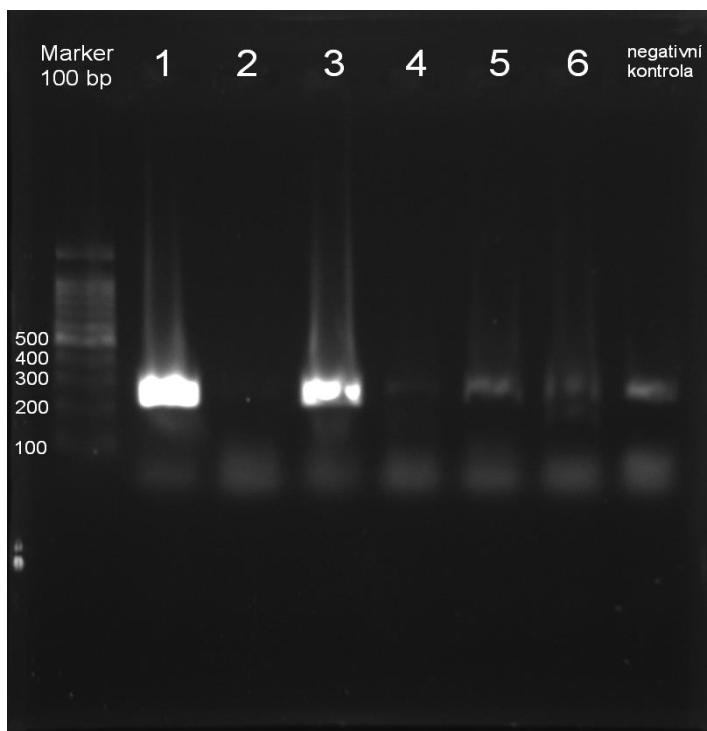
Thekke-Veetil T., Tzanetakis I. E. 2016. First Report of Strawberry polerovirus-1 in Strawberry in the United States. *Plant Disease*, 100(4).

Thompson J. R., Wetzel S., Klerks M. M., Vašková D., Schoen C. D., Špak J., Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* 111 (2), 85-93.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně. ISBN 80-210-3841-1.

Xiang Y., Bernardy M., Bhagwat B., Wiersma P. A., DeYoung R., Bouthillier M. 2014. The complete genome sequence of a new polerovirus in strawberry plants from eastern Canada showing strawberry decline symptoms. Springer Nature Switzerland AG. Part of Springer Nature.

9. Přílohy



Obr. 1: Vizualizovaný výsledek elektroforézy pod UV zářením. Jedná se o direct PCR s primery SPV 1F/1R – detekce *SPV1*. Vzorek 1 a 3 viditelně pozitivní (250 bp) – následně potvrzeno sekvenováním.



Obr. 2: Vzorově naroubovaná indikační rostlina. Dva rouby připevněny proužkem celofánu, ostatní listy odstraněny. Rostlina dále izolována několik dní v celofánovém sáčku.



Obr. 3: Listy rostliny nakažené *SPVI*, *SMYEV* a *SCV*. Jasně viditelné deformace listu, nepoměr ve velikosti lístků a světlá mozaika na listech.



Obr. 4: Onemocnění způsobené *SCRh1*. Patrné nekrotické léze na řapíku.