

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

Molekulární podstata chorob meruněk

Bc. Tomáš Starý

Brno 2011

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Brně 13. 5. 2011

Bc. Tomáš Starý

Chtěl bych poděkovat Mgr. Janu Lochmanovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při tvorbě diplomové práce.

Děkuji prof. Dr. Ing. Borisi Krškovi a Ing. Martinu Mészárosovi z Ústavu ovocnictví na MENDELU za pomoc při odběrech vzorků k analýze.

V neposlední řadě děkuji rodině, přátelům a blízkým za podporu, bez které by studium nebylo možné.

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část	7
2.1. Meruňka obecná	7
2.1.1. Zařazení	7
2.1.2. Popis	7
2.1.3. Hospodářský význam	8
2.1.4. Nároky	9
2.2. <i>Monilinia laxa</i>	10
2.2.1. Taxonomické zařazení	10
2.2.2. Význam, rozšíření	10
2.2.3. Nemoci, diagnostika, ochrana	11
2.2.4. Příbuzné patogeny	12
2.3. <i>Candidatus phytoplasma prunorum</i>	14
2.3.1. Taxonomické zařazení	14
2.3.2. Fytoplazmy	14
2.3.3. Význam, rozšíření	15
2.3.4. Nemoci, diagnostika, ochrana	15
2.4. <i>Pseudomonas syringae</i> , pv. <i>syringae</i>	17
2.4.1. Taxonomické zařazení	17
2.4.2. Význam, rozšíření	17
2.4.3. Nemoci, diagnostika, ochrana	17
2.5. <i>Cytospora cincta</i>	19
2.5.1. Taxonomické zařazení	19
2.5.2. Význam, rozšíření	19
2.5.3. Nemoci, diagnostika, ochrana	20
2.5.4. Kompetice <i>Cytospora cincta</i> a <i>Pseudomonas syringae</i> , pv. <i>syringae</i>	21
2.6. <i>Verticillium dahliae</i>	22
2.6.1. Taxonomické zařazení	22
2.6.2. Význam, rozšíření	22
2.6.3. Nemoci, diagnostika, ochrana	22
2.7. <i>Eutypa lata</i>	24
2.7.1. Taxonomické zařazení	25
2.7.2. Význam, rozšíření	25
2.7.3. Nemoci, diagnostika, ochrana	25
2.7.4. Toxiny produkované <i>Eutypa lata</i>	27

2.8. ITS oblasti	28
2.9. Design primerů pro PCR	29
2.10. Sekvence DNA pomocí fluorescenčně značených dideoxynukleotidů	30
3. Cíl práce	32
4. Metody	33
4.1. Odběr vzorků a izolace DNA	33
4.2. Konstrukce primerů pro PCR	34
4.3. PCR.....	36
4.4. Elektroforéza na agarózovém gelu	37
4.5. Přechištění PCR produktu před sekvenací	38
4.6. Sekvence	38
5. Výsledky	40
5.1. Návrh primerů	40
5.2. Odběr vzorků	41
5.3. Izolace a přechištění	45
5.4. Identifikace a vyhodnocení přítomnosti patogenů.....	47
5.4.1. <i>Candidatus phytoplasma prunorum</i>	47
5.4.2. <i>Monilinia laxa</i>	49
5.4.3. <i>Pseudomonas syringae</i> , pv. <i>syringae</i>	52
5.4.4. <i>Cytospora cincta</i>	55
5.4.5. <i>Verticillium dahliae</i>	60
5.4.6. <i>Eutypa lata</i>	61
6. Diskuze.....	64
7. Souhrn	69
8. Summary	70
9. Seznam zkratk.....	71
10. Seznam použité literatury	72

1. Úvod

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*) je ekonomicky významný ovocný strom. Daří se mu ve vinařských oblastech s kontinentálním klimatem s tuhou zimou potřebnou pro dormanci a teplým létem pro dozrání plodů. Škodí mu výkyvy teplot, zejména jarní mrazy. V případě nestálých teplot nebo jiných nepříznivých zásazích do organismu se *Prunus armeniaca* stává náchylnou k napadení bakteriálními nebo fungálními patogeny. Nemoci vyvolané těmito patogeny mají často velký negativní vliv na sklizeň plodů, většinou s letálním průběhem pro celý strom. Včasná a správná diagnóza přítomnosti patogenu zabraňuje jeho šíření a významně snižuje náklady spojené s chybně zvolenou léčbou nebo preventivními opatřeními. Náplní diplomové práce byl vývoj diagnostických metod na určení přítomnosti nejvýznamnějších patogenů napadajících *Prunus armeniaca* pomocí metod molekulární biologie a biochemie.

2. Teoretická část

2.1. Meruňka obecná

2.1.1. Zařazení

Doména:	<i>Eukaryota</i>
Říše:	<i>Plantae</i> (rostliny)
Třída:	<i>Rosopsida</i> (vyšší dvouděložné rostliny)
Podtřída:	<i>Rosidae</i>
Řád:	<i>Rosales</i> (růžotvaré)
Čeleď:	<i>Rosaceae</i> (růžovité)
Rod:	<i>Prunus</i> (slivoň)

2.1.2. Popis

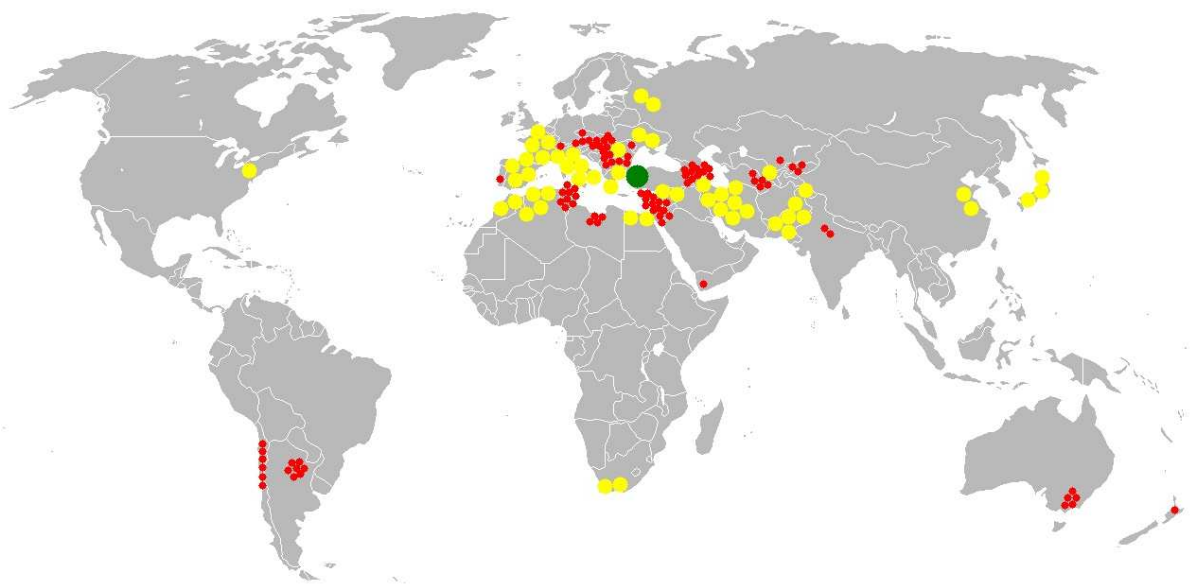
Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*, syn. *Armeniaca vulgaris*) je malý strom dosahující výšky do 10 m (Obrázek č. 1). Má nepravidelnou, širokou korunu větvící se blízko nad zemí. Šířka kmene je 30 - 60 cm, borka je hnědošedá, u mladých stromků hladká, později potrhaná. Listy jsou oválné, 5 - 9 cm dlouhé a 4 – 8 cm široké, dlouze řapíkaté, na konci mírně zašpičatělé, květy 2,5 cm široké, bílé nebo bledě růžové. Plodem Meruňky obecné jsou 4 - 8 cm velké peckovice charakteristické barvy se sametovým povrchem. Některé asijské druhy meruněk se mohou dožít až 300 let, v našich podmínkách se dožívají asi 80let, plodí 20-25 let. Meruňka má malý diploidní genom, $2n = 16$; 590 Mb/2n (Arumuganathan et al., 1991).



Obrázek č. 1 Meruňkový sad. Listopad 2010, Lednice, ČR.

2.1.3. Hospodářský význam

Již ve starověku tvořily meruňky významnou obchodní komoditu. Mezi významné producenty patřily Persie (území dnešního Íránu) a Egypt. V současné době je největším pěstitelem Turecko, následované právě Íránem, Pákistánem a státy Středomoří (Faostat, 2008). Od 20. století se meruňka pěstuje i v méně tradičních oblastech jako je jih Austrálie nebo Jihoafrická republika (Nečas et al, 2004). Celosvětové rozložení ukazuje obrázek č. 2. V roce 2004 byla celková produkce meruněk 2,7 milionu metrických tun (Grimplet et al., 2005). Ekonomicky nejvýznamnější je dužina plodu bohatá na vitamín A a C. Z jader peckovice se lisují velice kvalitní kosmetické meruňkové oleje. Jádra obsahují hořký glykosid amygdalin, který se používá při léčbě rakoviny (lék Laetrile). Rozkladem amygdalinu vzniká jedovatý kyanovodík. Meruňka je využívána také jako okrasný strom v zahradách a v neposlední řadě je i významný včelařský strom (Sorokina et al., 2009).



Obrázek č. 2 Produkce meruněk v roce 2005 vyjádřená jako procenta největšího producenta (Turecko, 390 000 tun). Zelená=100%, Žlutá=10%, Červená=1% (Apricot, Wikipedia, 2011).

2.1.4. Nároky

Meruňka obecná formovala svůj genom v oblastech s kontinentálním klimatem (pravděpodobně střední hornatá Čína), které se vyznačuje významnými rozdíly v teplotách vzduchu mezi různými fázemi dne i roku a nízkými úhrny srážek. Letní teploty zde mohou překročit 30°C, v zimě klesají k -20 až -30°C. Navzdory tomu je kontinentální klima stabilní, bez náhlých výkyvů. V důsledku vysokých nároků na snášenlivost širokého intervalu teplot je meruňka, jako většina peckovin, otužilý organismus a pro správnou dormanci vyžaduje tuhou zimu. Květní pupeny snesou -23 až -25°C. Květy se objevují relativně brzy po vzestupu teplot a jsou velmi náchylné na jarní mrazy. Je pro ně zničující už pokles teploty na -2,5 až -3,5°C. Meruňkám se daří na lehkých, suchých, písčitých, dobře provzdušněných půdách s jílovým podkladem, pH 6 až 7. Vhodné podmínky nacházejí například ve vinařských krajích jižní Moravy. Nejběžnější odrůdou na jižní Moravě je odrůda Velkopavlovická (Nečas et al., 2004, Sorokina et al, 2009). Meruňka obecná je poměrně citlivá k napadení mnoha patogeny. Nejvýznamnějším patogenům jsou věnovány následující kapitoly teoretické části diplomové práce.

2.2. *Monilinia laxa*

(*Monilia cinerea*, *Oospora cinerea*, *Sclerotinia cinerea*, *Sclerotinia laxa*)

2.2.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Eukaryota</i>
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>
Podkmen:	<i>Pezizomycotina</i>
Třída:	<i>Leotiomycetes</i>
Podtřída:	<i>Leotiomycetidae</i>
Řád:	<i>Helotiales</i>
Čeleď:	<i>Sclerotiniaceae</i>
Rod:	<i>Monilinia</i>
Druh:	<i>Monilinia laxa</i> (Biolib, 2002)

2.2.2. Význam, rozšíření

Monilinia laxa je jeden z nejrozšířenějších a nejzávažnějších patogenů peckovin. Napadá zejména rod *Prunus*, kde působí obrovské hospodářské škody. Snižuje objem a kvalitu sklizně napadením květů moniliniovým úžehem a plodů moniliniovou hnilobou. Je patogenem severního mírného pásma, původem pravděpodobně z Asie, ale v souvislosti s rozšířením pěstování meruněk byl popsán už i v Austrálii. Mezi nejchoulostivější organismy k napadení *M. Laxa* patří meruňka a višeň (Juroch et al., 2006).

2.2.3. Nemoci, diagnostika, ochrana

Infekce patogenem *Monilinia laxa* se projevuje dvěma způsoby. Jedná se o moniliniovou spálu (úžeh) a o moniliniovou hnilobu.

Moniliniová spála je onemocnění vegetativních orgánů rostliny, k infekci významně napomáhá vysoká vlhkost až 85% a teplota pod 12°C. Nemoc dostala svůj název podle charakteristických projevů napadení. Strom vypadá, jako by ho spálil mráz (Obrázek č. 3). Branou infekce je květ nebo květní pupen. Patogen prorůstá bliznou do semeníku, infikuje květ a následně i letorosty, kde se objevují nekrotické skvrny. Sekundární metabolity produkované monilinií způsobují velmi rychlé odumření infikovaných částí rostliny (dny, nejpozději 2 týdny). Příčina smrti je přerušení transportu vody a živin. V okolí infikovaných míst se často tvoří rány s klejotokem, které mohou sloužit jako místo vstupu sekundárních infekcí (Juroch et al., 2006).



Obrázek č. 3 Moniliniová spála listu meruňky. Červenec 2010, Lednice, ČR.

Moniliniová hniloba je naopak nemocí plodů. Patogen na nich vyvolává charakteristické skvrny, které se v krátké době rozšíří po celém plodu (Obrázek č. 4). Hlavní

období pro infekci je dozrávání, kdy je ovoce náchylné k poranění, protože infekci často předchází mechanické porušení plodu kroupami, hmyzem nebo ptáky. Ideální podmínky k infekci plodů a rozvoji hniloby jsou teplota nad 20°C a vysoká vlhkost. Část shnilých plodů mumifikuje a zůstává na stromě, kde je pak zdrojem dalších infekcí následující rok. V případě, že došlo k napadení již během kvetení, může *M. laxa* přežívat i v napadených pletivech. Konidie se pak dále šíří větrem a deštěm (VSUO, 2011).



Obrázek č. 4 Moniliniová hniloba plodu meruňky (VSUO, 2011).

Na ochranu meruňkových stromů před moniliniovou infekcí je možné provést několik opatření. V první řadě se jedná o vhodnou volbu místa výsadby. Vybírají se suchá místa s dostatkem slunce se správným složením půdy. Dále je vhodné po sklizni odstranit viditelně napadené plody a letorosty. V případě, že nastane počasí vhodné pro infekci patogenem, je žádoucí využít postřiky fungicidy (Juroch et al., 2006).

2.2.4. Příbuzné patogeny

Mezi významné patogeny z rodu *Monilinia* kromě *Monilinia laxa* patří i *Monilinia fructicola* a *Monilinia fructigena*. Mají podobné příznaky, jsou ovšem poměrně dobře rozlišitelné metodami molekulární biologie nebo kultivací na bramborovém dextrózovém agaru, PDA (Obrázek č. 5), (Snyder et al., 1991).



Obrázek č. 5 Kultury rodu *Monilinia*. 1. *M. fructigena*, 2. *M. laxa*, 3. *M. fructicola* (EPPO Gallery, 2008).

M. fructigena je parazitem zejména jádroviny, ale často infikuje společně s *M. laxa* i peckoviny. Vyskytuje se v Evropě, Asii (Čína, Korea) a v Americe (USA, Kuba). *M. fructicola* má podobný hostitelský okruh jako *M. laxa*. Můžeme zde sledovat určitou odlišnost v patogenitě. *M. laxa* vyvolává častěji úžeh stromu, naproti tomu *M. fructicola* častěji hnilobu plodů. V Evropě se *M. fructicola* vyskytuje velmi ojediněle. Častá je v Americe. Srovnání napadených plodů meruňky rozdílnými rody *Monilinia* je na obrázku č.6 (Juroch et al., 2006).



Obrázek č. 6 Srovnání infikovaných plodů meruněk různými patogeny rodu *Monilinia*. 1. kontrolní vzorek, 2. a 6. *M. laxa*, 3. a 4. *M. fructigena* 5. *M. fructicola* (EPPO Gallery, 2008).

2.3. *Candidatus phytoplasma prunorum*

(ESFY – *phytoplasma*, ACLR - *phytoplasma*)

2.3.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Tenericutes</i>
Třída:	<i>Mollicutes</i>
Řád:	<i>Acholeplasmatales</i>
Čeleď:	<i>Acholeplasmataceae</i>
Rod:	<i>Phytoplasma</i>
Druh:	<i>Candidatus phytoplasma prunorum</i> (Biolib, 2002)

2.3.2. Fytoplazmy

Fytoplazmy jsou grampozitivní bakterie parazitující na širokém spektru rostlin a hmyzu. V rostlinách se nacházejí v zejména sítkovicích, šíří se pomocí asimilačního toku. U hmyzu jsou přítomné v hemolymfě, trávicím traktu a orgánech sajících rostlinné šťávy. Nemoc je často latentní, ovšem existují i případy symbiózy fytoplazma - hmyz. Fytoplazmy jsou obalené pouze cytoplazmatickou membránou, buněčná stěna chybí. Absence buněčné stěny je jedním ze znaků adaptace fytoplazem na intracelulární parazitický způsob života. Dalším znakem je malý genom (530 – 1350 kbp, Carginale et al., 2004), zajišťující jen bazální životní funkce s ohledem na využití biochemické výbavy hostitelské buňky. Například chybí geny kódující transkripci základní enzymů Krebsova cyklu. Jelikož životní nároky fytoplazem neumožňují pěstování in vitro, byly dlouho považovány za viry. Studium fytoplazem bylo díky tomu velmi komplikované, převrat přineslo až možnost využít metody molekulární biologie při zkoumání specifické sekvence 16S rRNA. Přenášejí se hmyzem, vegetativně prostřednictvím roubov a oček nebo parazitickými rostlinami. Ekonomický význam fytoplazem je velký. Významně snižují výnos a kvalitu úrody, způsobují úmrtní hostitelů. Do nákladů

se musí započítat i preventivní opatření, které jsou často jediným účinným nástrojem v boji s fytoplazmami (Navrátil et al., 2008).

2.3.3. Význam, rozšíření

Fytoplazma napadající rod *Prunus* je *Candidatus phytoplasma prunorum*. Je hojným parazitem ve většině evropských zemí. V rámci EU platí přísná opatření snažící se zabránit šíření *Candidatus phytoplasma prunorum*. Vyvážené rostliny musí mít rostlinolékařský pas, který dokládá jejich původ z oblasti bez výskytu onemocnění. Patogen v ČR infikuje zejména meruňky, méně pak broskvoně (Navrátil et al., 2008).

2.3.4. Nemoci, diagnostika, ochrana

Candidatus phytoplasma prunorum způsobuje nemoc ESFY (European stone fruit yellows, Evropská žloutenka peckovin) a proto se jí také říká ESFY – fytoplasma. U meruněk je též označována jako ACLR – fytoplasma (Apricot chlorotic leaf roll, chlorotická svinutka listů meruněk). Typickým příznakem u meruněk je předčasný opad, mírná žloutenka a chlorotická svinutka listů (Obrázek č. 7). Projevy jsou důsledkem odebírání živin rostlině fytoplazmou. Svinutka a žloutenka listů mohou mít ale i jiný původ než ESFY. Infekce se projeví i na plodech. Jsou menší, dozrávají předčasně a stejně jako listy předčasně opadávají. Někdy může mít infekce ESFY příznaky podobné moniliniiovému úžehu. Dále je možné sledovat depresi v růstu, odumírání kosterních větví i celé koruny. Symptomy jsou dobře patrné v pozdním létě a na podzim. Infekce je pro strom latentní do 1 – 2 let od prvních příznaků. (Navrátil et al., 2008, Nečas et al., 2006).



Obrázek č. 7 Svinutka listů meruněk. Červenec 2010, Lednice, ČR.

K diagnostice onemocnění se kromě sledování fenotypových projevů používá i molekulárně diagnostická metoda PCR. Vyskytly se však problémy s nespecifickými primery. Analýzy často vedly k falešně pozitivním výsledkům díky homologním sekvencím ESFY - fytoplazmy s plastidovou DNA hostitelských rostlin (Navrátil et al., 2008, Nečas et al., 2006).

Ochrana před ESFY – fytoplazmou má zejména preventivní charakter - výsadba odolných druhů rostlin, zabránění dovozu sazenic z oblastí diagnostikovanou ESFY a likvidace možných přenašečů. Tradiční baktericidní přípravky (mědnaté sloučeniny) na ni nezabírají, plošné používání antibiotik je zase problematické z hlediska vzniku rezistentních forem bakterií (Navrátil et al., 2008, Nečas et al., 2006).

2.4. *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*

2.4.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Proteobacteria</i>
Třída:	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Řád:	<i>Pseudomonadales</i>
Čeleď:	<i>Pseudomonadaceae</i>
Rod:	<i>Pseudomonas</i>
Druh:	<i>Pseudomonas syringae</i> , pv. <i>syringae</i> (Biolib, 2002)

2.4.2. Význam, rozšíření

Pseudomonas syringae jsou gramnegativní aerobní bakterie s 6 Mbp genomem. Své jméno dostaly podle Šeříku obecného (*Syringa vulgaris*), z kterého byly poprvé izolovány. Analýzou 16S rRNA bylo identifikováno přes 50 patovarů lišících se hostiteli i patogenitou. Díky velké variabilitě patovarů je *P. syringae* geograficky velmi rozšířená. Daří se jí ve studených, vlhkých podmínkách. Ideální teplota se pohybuje v rozmezí 12–25°C v závislosti na patovaru. Žijí na povrchu listů. V případě nedostatku hostitelů mohou přejít i na saprofitický způsob života. Buněčná stěna *P. syringae* obsahuje velmi zajímavé proteiny, které svým prostorovým uspořádáním simulují nukleační jádra krystalu ledu. Může tak vyvolávat tvorbu ledu i při poměrně vysokých teplotách. Bakterie, které se pohybují v atmosféře tak pomocí těchto proteinů dokážou vyvolat dešťové nebo sněhové srážky a vrátit se zpět na povrch země (Maki et al.1974, Sze et al., 2010).

2.4.3. Nemoci, diagnostika, ochrana

Rod *Prunus* napadá patovar *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*. Bakterie pronikají do pletiv poraněných nebo jinak oslabených rostlin a uvolňují bakteriální toxiny

(syringomycin, syringopeptin) a enzymy degradující buněčnou stěnu. Způsobují nekrózu pletiv (Obrázek č. 8) a následné odumření větví nad místem infekce, tzv. mrtvici meruněk neboli apoplexii. Ve vlhkém počasí na jaře nebo začátkem léta mohou bakterie prostupovat průduchy listů. Produkují extracelulární protein Harpin_{PSS} o velikosti 34,7 kD, který elicituje hypersenzitivní reakci rostliny vedoucí až k nekróze (Sze et al., 2010, Yang He et al., 1993).

V boji s *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* se používají baktericidní přípravky na bázi měďnatých sloučenin. V menší míře se aplikují antibiotika. Tyto přípravky ale zcela účinné nejsou a tak nejúčinnější léčbou zůstává prevence. Sem patří odřezávání a likvidace napadených větví nebo celých stromů (Sze et al., 2010)



Obrázek č. 8 Hnědá skvrna a klejotok způsobené patogenem *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* (Royal Horticultural Society, 2010).

2.5. *Cytospora cincta*

(*Valsaria insitiva*, *Cytospora rubescens*, *Diatrype aethiops*, *Diatrype cincta*, *Diatrype viticola*, *Dothidea rudis*, *Leucocytospora cincta*, *Leucostoma cinctum*, *Massariella syconophila*, *Myrmaecium cinctum*)

2.5.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Eukaryota</i>
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>
Podkmen:	<i>Pezizomycotina</i>
Třída:	<i>Dothideomycetes</i>
Podtřída:	<i>Dothideomycetidae</i>
Rod:	<i>Valsaria</i>
Druh:	<i>Cytospora cincta</i> (Biolib, 2002)

2.5.2. Význam, rozšíření

Cytospora cincta, známá též pod názvy *Valsaria insitiva* nebo *Leucostoma cinctum*, je parazitická houba napadající rod *Prunus*, zejména pak broskvoň, meruňku, švestku a třešeň. Je hojná v Kanadě, USA a Evropě a vyskytuje se i v Jižní Americe a Japonsku. Obecně se jí nejvíce daří v oblastech s tuhou zimou. Způsobuje typické cytosporové vředy na větvích a apoplexií. Zkracuje život stromů, infikované stromy mají menší produktivitu plodů. V případě projevu apoplexie u nosné větve může strom přijít až o polovinu úrody a významné jsou i ekonomické náklady vynakládané v boji s chorobou (Biggs et al., 2005).

2.5.3. Nemoci, diagnostika, ochrana

Projevem napadení *Cytospora cincta* je tmavě hnědá, elipsoidní nekrotická skvrna na kůře, podélná s větví, často v místě větvení. V místě nákazy se objeví klejotok, který má z počátku světlou jantarovou barvu. Tvorba klejotoku je běžnou reakcí rostliny na napadení, ovšem v případě ataku *Cytospora cincta* je uvolňování neobvykle silné. S postupem času mění klejotok svou jantarovou barvu a tmavne. Xylém pod místem napadení hnědne, což je způsobeno toxiny houby. Při pokračující infekci kůra vysychá, praská a obnažuje zčernalé dřevo (Obrázek č. 9). Místem vstupu infekce jsou různá poranění, například i drobná ranka po opadu listu. Vstupem jsou i odumírající větve neschopné produkovat dostatečné množství klejotoku nebo vředy na větvích způsobené infekcí jiným patogenem, typicky *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* nebo *Eutypa lata*. Citlivé jsou jednoroční výhonky, od kterých se patogen šíří do nosných větví. Nad místem nákazy větev pomalu odumírá – apoplexie. K nákaze dochází na konci podzimu nebo na začátku jara, kdy je strom v zimním klidu, ale teploty jsou dostatečně vysoké pro houbovou aktivitu. Při vyšších teplotách strom ukončí dormanci a hojivé pletivo kalus zbrzdí růst vředu. S poklesem teplot a nástupem další dormance ale může houba znovu aktivovat svůj růst. V důsledku toho jsou na starším vředu patrné letokruhy. Spóry *C. cincta* se šíří deštěm, větrem, hmyzem a rozšiřují je i infikované sadařské nástroje. Pro úplnost je třeba dodat, že *C. cincta* není jediným houbovým parazitem způsobujícím výše zmíněné příznaky. Apoplexii a cytosporové vředy rodu *Prunus* způsobuje i houba s názvem *Leucocytospora leucostoma*. Lze se často setkat s označením leukostomové vředy pro stejný patologický projev (Biggs et al., 2005).



Obrázek č. 9 Vřed s klejotokem způsobený houbou *Cytospora cincta* (Biggs et al., 2005).

Ochrana rostlin a před napadením a šířením *C. cincta* má opět zejména preventivní charakter. Jde o zabránění vzniku mechanických poškození, popřípadě ošetření vzniklých ran, které jsou hlavní branou infekce. Alternativou je také pěstování teplotně rezistentních kultivarů *Prunus*, které jsou více imunní k šíření nákazy v zimních měsících. Infikované stromy se léčí fungicidy, ale nejúčinnější metodou pro zabránění šíření infekce na okolní stromy je odstranit napadené jedince ze sadu (Biggs et al., 2005).

2.5.4. Kompetice *Cytospora cincta* a *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*

Patogeny *C. cincta* a *P. syringae*, pv. *syringae* jsou nejčastější příčinou vzniku vředů a apoplexie na rodu *Prunus*. Zatímco *C. cincta* patří k eukaryotám, *P. syringae* je bakterie. Mohou parazitovat i na stejném jedinci. Studie ale ukazují, že dlouhodobější koexistence těchto patogenů v jednom hostiteli je nereálná. *C. cincta* využívá vředy způsobené *P. syringae*, pv. *syringae* jako jednu ze vstupních brán do organismu, ovšem po infekci začne acidifikovat prostředí z pH 5,2 až do pH kolem 3,8. *P. syringae*, pv. *syringae* je citlivá už k pH mezi 4 až 5, což jí v kompetici s *C. cincta* nedává mnoho šancí k přežití. To vysvětluje starší studii, kdy byla z rodu *Prunus* *C.cincta* izolovatelná po celé vegetační období, zatímco *P. syringae*, pv. *syringae* jen v počátku infekce a později její množství klesalo (Endert - Kirkpatrick, et al., 1987).

2.6. *Verticillium dahliae*

(*Verticillium ovatum*, *Verticillium tracheiphilum*)

2.6.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Eukaryota</i>
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>
Podkmen:	<i>Pezizomycotina</i>
Třída:	<i>Sordariomycetes</i>
Podtřída:	<i>Hypocreomycetidae</i>
Řád:	<i>Hypocreales</i>
Rod:	<i>Verticillium</i>
Druh:	<i>Verticillium dahliae</i> (Biolib, 2002)

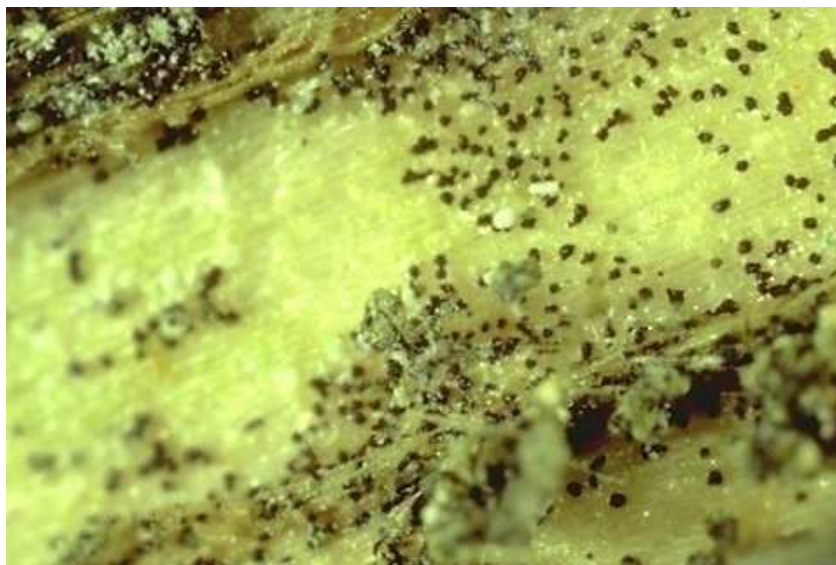
2.6.2. Význam, rozšíření

Verticillium dahliae je patogenem více než 200 druhů rostlin. Napadá i hospodářsky významné plodiny jako jsou brambory, rajčata, bavlna, jahody a v neposlední řadě i rod *Prunus*. K rezistentům patří jabloň, dub nebo ořech. Je rozšířena zejména v oblastech s mírným klimatem, optimum má při teplotách 25 - 28°C. V závislosti na napadeném organismu hyne infikovaná rostlina nebo strom velmi rychle už během sezóny kdy nákaza proběhla, nebo pozvolna usychá mnoho let. Šíří se unášením půdy prostřednictvím větru nebo deště (Fradin et al., 2006, Summit Landscape, 1998).

2.6.3. Nemoci, diagnostika, ochrana

V. dahliae žije v půdě a napadá kořeny rostlin oslabených stresem nebo jinak choulostivé kataluku patogenu. Infekci často podléhají stromy rostoucí na suchých, přesolených nebo nedostatečně vyživovaných půdách. Významným činitelem může být přítomnost nematody *Pratylenchus penetrans*, která oslabuje organismus rostliny a činí

ji náchylnější k nemocem. V zemi přežívá houba ve formě malých černých mikrosklerotí až 10 let (Obrázek č. 10). *V. dahliae* způsobuje nemoc nazývanou verticilliové vadnutí. Primární příčina je penetrace kořenů houbou, na kterou rostlina reaguje omezením toku vody vodivými pletivy s cílem zabránit jejímu šíření. Následky jsou pro rostlinu zničující. Během léta začnou listy náhle žloutnout nebo červenat při okrajích, svinovat se a následně hnědnout a usychat. Příznaky na listech se mohou projevit jak na celých ramenech stromu, tak i na jednotlivých vedlejších větvích v rámci jednoho ramena, přičemž ostatní větve ramena zůstávají bez příznaků. Na dřevě vadnoucích větví se objeví charakteristické pruhy nebo skvrny (Obrázek č. 11). Jejich barva závisí na době trvání infekce i na rostlinném druhu. Verticilliové vadnutí způsobuje kromě *Verticillium dahliae* i *Verticillium albo-atrum*. *V. albo-atrum* preferuje chladnější oblasti a atakuje menší množství rostlinných druhů než *V. dahliae*, ale jinak mají patogeny podobné charakteristiky (Fradin et al., 2006, Summit Landscape, 1998).



Obrázek č. 10 Mikrosklerotia *V. Dahliae* (Summit Landscape, 1998).

Jako léčba se doporučuje prořezávat napadené větve a aplikovat fungicidy. Pro zlepšení vitality stromu se používá kořenové hnojení bohaté na dusík a draslík. Fungicidy a hnojením se docílí zpoždění postupu nemoci i o roky, ovšem jakmile je *V. dahliae* již přítomno v kořenech, úplné vyléčení je složité a léčba má jen udržovací charakter.

Méně odolné druhy nemusí na ozdravování reagovat vůbec a hynou. Jelikož *V. dahliae* v půdě přežívá i několik let, doporučuje se místo výskytu nemoci po odumřelých stromech osazovat jen rezistentními druhy (Fradin et al., 2006, Summit Landscape, 1998).



Obrázek č. 11 Verticilliová nákaza na javoru. Vlevo odumírající koruna, vpravo vadnoucí list a pruhy na dřevě (HortAnswers, 2011, Munkvold et al., 2001).

2.7. *Eutypa lata*

(*Eutypa armeniaca*, *Cryptosphaeria crepiniana*, *Cryptosphaeria myriocarpa*, *Cytosporina lata*, *Cytosporina ribis*, *Cytosporina rubescens*, *Diatrype lata*, *Diatrype macrothecia*, *Diatrype milliaria*, *Eutypa ambigua*)

2.7.1. Taxonomické zařazení

Doména:	<i>Eukaryota</i>
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>
Třída:	<i>Sordariomycetes</i>
Podtřída:	<i>Xylariomycetidae</i>
Řád:	<i>Xylariales</i>
Čeleď:	<i>Diatrypaceae</i>
Rod:	<i>Eutypa</i>
Druh:	<i>Eutypa lata</i> (Biolib, 2002)

2.7.2. Význam, rozšíření

Houba *Eutypa lata* byla izolována z širokého množství druhů rostlin, ale zdaleka ne u všech způsobuje onemocnění. Je významný patogen révy vinné, rozšířená je u červeného rybízu a u rodu *Prunus*, zvláště pak u meruněk. Často se můžeme setkat se synonymním názvem *Eutypa armeniaca*. *E. lata* se vyskytuje zejména ve vinařských oblastech Austrálie, Jihoafrické republiky nebo Evropy a hojná je i v USA, Brazílii, Kanadě a Izraeli. Askospóry se šíří větrem, z plodnice se uvolňují při deštivém počasí, optimální teplota pro infekci je 22-25°C. Nemoc způsobuje vadnutí a úhyn větví. Na uhynutých větvích může přežívat jako saprofyt. Ekonomický dopad snižuje fakt, že větve jsou schopné dále plodit a nemoc má pomalý průběh. Často však s letálním koncem (Munkvold et al., 2001).

2.7.3. Nemoci, diagnostika, ochrana

Eutypa lata vyvolává nemoc zvanou eutypové odumírání, známé pod anglickým názvem *Eutypa dieback*. Lze se setkat i s označeními eutypóza a mrtvé rameno. Nemoc je nejvíce prozkoumána na révě vinné, kde napadá starší rostliny a způsobuje odumírání ramen a celých keřů. Příznaky, které nejsou pozorovatelné u jiné infekce, jsou malé, chlorotické, pokřivené listy, které s postupem sezóny vadnou a trhají se. Na dřevu jsou

patrné typické zbarvení do tvaru písmene V (Obrázek č. 12). U meruněk se *E. lata* objevuje taktéž zejména ve starších sadech, první příznaky se objevují cca. 18 měsíců po infekci. Projevem je náhlý kolaps větve během léta. Listy vadnou, ale zůstávají přisedlé k větvi (Obrázek č. 13). Typické příznaky nemoci na listech révy vinné se u meruněk neobjevují. V dolní části infikované větve jsou patrné vředy s výrazným klejotokem. S postupem infekce dřevo křehne a stává se náchylnější k lámání. Stejně jako u révy je patrné prorůstání houby kmenem (Munkvold et al., 2001).



Obrázek č. 12 Skvrny ve tvaru písmene V, typický příznak napadení révy vinné houbou *E. lata* (Munkvold et al., 2001).

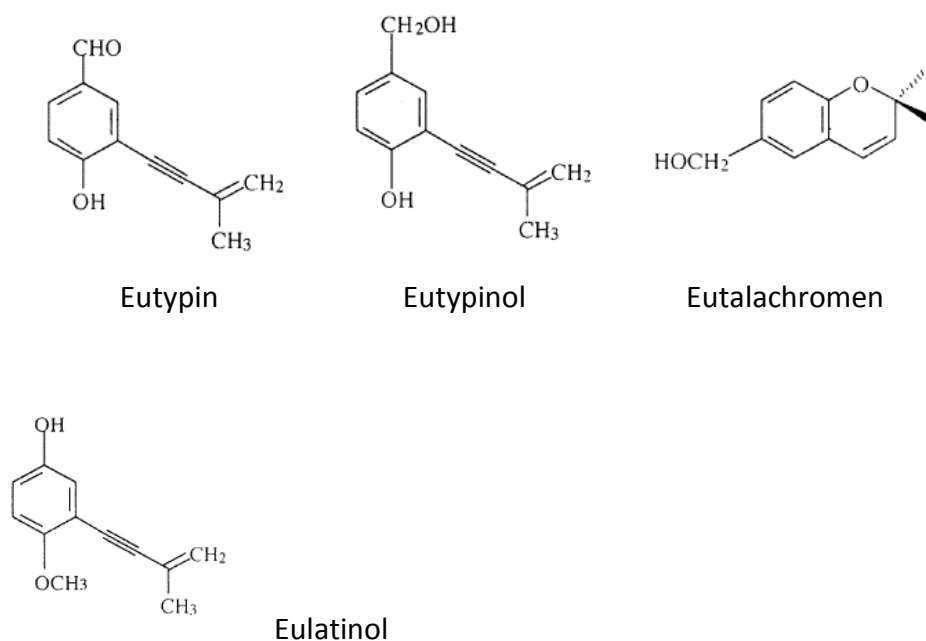


Obrázek č. 13 Zvadlé listy rodu *Prunus* způsobené infekcí *E. lata* (Munkvold et al., 2001).

Poté, co houba proroste dřevem, není možné aplikovat účinnou léčbu. Obecně postihuje oslabené rostliny, je tedy výhodné před atakem patogenu rostliny posilovat hnojením nebo vysazovat odolné druhy. Doporučuje se také prořezávat stromy a rány ošetřit fungicidy a latexem (Munkvold et al., 2001).

2.7.4. Toxiny produkované *Eutypa lata*

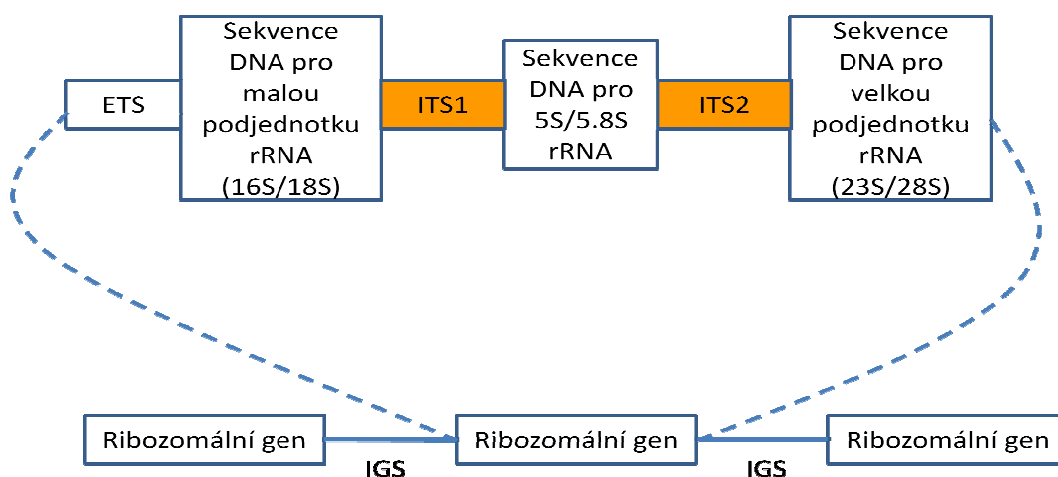
E. lata produkuje také bakteriální toxiny (Obrázek č. 14). Za nejvýznamnější toxin je považovaný eutypin. Je to slabá kyselina ($pK = 6,2$) a způsobuje významnou inhibici respiračního řetězce mitochondrií prostřednictvím změny pH v rostlinné buňce. Společně s eulatachromenem, dalším toxinem, je považovaný za hlavní příčinu patogenních účinků *E. lata*. Studie ale ukázaly, že patogeny *E. lata* izolované v Kalifornii a Austrálii eutypin neprodukuje a projevy nemoci jsou i přesto jasně patrné. Byla však u nich objevena zvýšená produkce jiných toxinů, eutypinolu a eulatinolu. To vede k názoru, že patogenní účinky *E. lata* vychází z produkce různých toxinů se specifickými účinky na rostlinnou buňku a projev nemoci záleží na hostitelském organismu (Kim et al., 2004).



Obrázek č. 14 Toxiny produkované *E. lata* (Kim et al., 2004)

2.8. ITS oblasti

Gen pro ribozom se skládá z kódujících a nekódujících oblastí (Obrázek č. 15). Kódující oblasti jsou vysoce konzervativní. Nekódující oblasti jsou naopak značně variabilní, což se vysvětluje nízkým evolučním tlakem na nefunkční DNA. Sekvence se liší i v rámci velmi příbuzných druhů. Přepisované nekódující mezerníky ITS1 a ITS2 (vnitřní přepisovaný mezerník, internal transcribed spacer) jsou proto oblasti hojně využívané v taxonomických studiích a v molekulární biologii k návrhu diagnostických primerů pro identifikaci jednotlivých druhů organismů. Výhodné jsou ITS oblasti i z toho důvodu, že se ribozomální DNA v genomu nachází v mnoha kopiích (Museum of Learning, 2011). Do oblastí ITS1 a ITS2 byly navrženy primery i pro diagnostiku chorob meruněk. Výjimku představuje návrh primerů *Monilinia laxa*, kde byly použity sekvence z RAPD analýzy (Côte et al., 2004).



Obrázek č. 15 Transkripční jednotka se skládá z kódujících sekvencí pro rRNA a nekódujících sekvencí ETS (vnější přepisovaný mezerník, external transcribed spacer), ITS1 a ITS2. DNA kódující přepis ribozómů má až stovky opakujících se transkripčních jednotek. Rozdělují je intergenové nepřepisované mezerníky (intergenic spacer, IGS). Velikosti ribozomálních jednotek se u prokaryot a eukaryot liší (Tabulka č. 1), (Museum of Learning, 2011).

Tabulka č. 1

	Prokaryota	Eukaryota
Malá podjednotka	16S	18S
Velká podjednotka	5S, 23S	5S, 5.8S, 28S
S celého ribozómu	70S	80S

Tabulka č. 1 Sedimentační koeficienty ribozomální RNA prokaryot a eukaryot. Sedimentační koeficienty jsou uvedeny ve Svedbergových jednotkách ($1S = 10^{-3}s$) a udávají, za jak dlouho sedimentuje RNA v ultracentrifuze (Voet et Voet, 1995).

2.9. Design primerů pro PCR

PCR primer je krátký řetězec několika bází DNA, který je komplementární k diagnostikované oblasti. Je nutný k zahájení polymerázové řetězové reakce, protože enzym polymeráza dokáže nasednout pouze na dvouřetězcové molekuly DNA. Syntetické primery používané v PCR musí mít několik specifických vlastností. Ideální délka primerů je mezi 18 - 22 bázemi. Taková délka zajišťuje dostatečnou specifitu a zároveň snadnou vaznost k templátové DNA. Teplota tání (T_m) indikuje stabilitu vazby duplexu primer – templát. Čím vyšší obsah guaninu a cytosinu (tzv. GC poměr, minimálně 40%) a čím delší primer, tím vyšší T_m . Ideální T_m by měla být mezi 52 – 58°C. Podle T_m primerů volíme annealingovou teplotu PCR (T_a). V případě příliš nízké T_a nasedají primery na nespecifické sekvence a vytvoří nežádoucí produkt, při vysoké T_a naopak nasedají neochotně i na komplementární DNA. Ideální T_a má být asi o 5°C nižší než T_m . Maximální rozdíl annealingové teploty mezi přímým a revezním primerem je 5°C. Dalším bodem při designu primerů je umístění guaninu a cytosinu na 3' konci primeru. Guanin a cytosin spojují tři vodíkové můstky. Primer s vysokým GC poměrem má tedy vyšší vazebnou energii s templátovou DNA než při vysokém poměru adeninu a thyminu. Přítomnost G a C na 3' konci primeru přispívá k silnější vaznosti primer – templát. Velmi důležitá vlastnost primerů je jejich schopnost tvořit vzájemné intermolekulární a intramolekulární struktury, které znemožňují primerům navázání na templát. Intramolekulární vlásenky by neměly mít ΔG nižší než -2 kcal/mol. Intermolekulární strukturu tvoří komplementární primery, které se spojují ochotněji

navzájem než s templátovou DNA. Akceptovatelná minimální ΔG primerových dimerů je -10 kcal/mol. Z důvodu správného navázání na templátovou DNA nesmí primery dimerizovat na 3' konci. Vzdálenost mezi přímým a reverzním primerem a tudíž velikost amplifikované DNA by neměla přesáhnout 250 bazí (Premier Biosoft International, 2011).

2.10. Sekvence DNA pomocí fluorescenčně značených dideoxynukleotidů

Pro určení sekvence DNA byla použita metoda sekvenace využívající dideoxynukleotidů (ddNTPs) s navázanou fluorescenční značkou, která po excitaci laserem vyzařuje světlo o určité vlnové délce. V reakční zkumavce se namíchá směs sekvenované DNA, deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs), dideoxynukleotidtrifosfátů (ddNTPs), DNA polymerázy a primeru. Protokol je podobný jako při klasické PCR. První fází je teplotní denaturace dsDNA při 95°C. Následuje pokles teploty na 50°C a nasednutí primerů na templátové sekvence. Po zvýšení teploty na 72°C začne *Taq* polymeráza prodlužovat řetězec přidáváním deoxynukleotidů až do momentu, kdy je do řetězce zařazen dideoxynukleotid. Jelikož ddNTP nemá na 3' uhlíku hydroxyskupinu, nemůže se za něj zařadit další nukleotid a prodlužování řetězce se zastaví. Zařazení ddNTPs do řetězce je ovlivněno pouze poměrem koncentrace dNTPs / ddNTPs v reakční zkumavce. Délka řetězce tedy závisí pouze na statistické pravděpodobnosti zařazení ddNTP. Aby nevznikaly jenom krátké řetězce, jsou dNTPs ve směsi v nadbytku. Namnožené úseky se podrobí kapilární elektroforéze v tekutém polyakrylamidovém médiu. Kratší úseky DNA migrují rychleji. Těsně před dosažením kladné elektrody jsou DNA fragmenty ozářeny laserovým paprskem, který excituje fluorescenční značky na ddNTPs. Každý ze čtyř ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP) má vlastní fluorescenční značku vyzařující maximálně na jiné vlnové délce, kterou měří spektrofotometr. Počítač se speciálním softwarem převádí zachycené vlnové délky do digitálních dat. Na základě doby průchodu DNA kapilárou a vyzářené vlnové délce vytváří digitální fragmenty DNA. Fragmenty poté vzájemně porovnává a sestavuje výslednou sekvenci (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide, 2009)

Jestliže je sekvenace prováděna přímo ze vzorku po PCR, zůstávají v mikrozkuhavce nezreagované primery a nukleotidy, které ruší průběh sekvenační reakce. Z toho důvodu jsou

vzorky vzorky přečišťovány alkalickou fosfatázou a exonukleázou I. Alkalická fosfatáza defosforyluje volné nukleotidy a restriční endonukleáza I. štěpí primery.

3. Cíl práce

S globalizací světových trhů roste riziko přenosu chorob z obchodovaných komodit a zvyšují se nároky na zabránění šíření karanténních škodlivých organismů. Příkladem preventivních opatření může být povinný rostlinolékařský pas v zemích EU, který ukládá pěstitelům povinnost prokázat, že nabízené ovoce pochází z neinfikovaného sadu. Pěstitelů *Prunus armeniaca* se týká například prokázání nepřítomnosti *C.P. prunorum* způsobující nemoc ESFY v sadu, odkud pochází nabízené plody. Identifikace nepřítomnosti patogenů na základě projevů nemoci je ale poměrně složitý proces. Přitom chybná nebo nepřesná diagnostika může mít vliv na rozšíření patogenu nebo zvolení způsobu léčby a eliminace patogenu ze sadu. Identifikaci nelze založit pouze na patologickém projevu patogenu. Ten se ve stromu může vyskytovat i poměrně dlouhou dobu bez patologických změn na rostlinných pletivech. Navíc nemoci způsobené patogeny různého fylogenetického zařazení mají často podobné projevy. Metody použité v rámci diplomové práce mají potenciál diagnostikovat patogeny ještě před jejich patologickým projevem a značně tak zpřesnit, urychlit a zjednodušit identifikační procedury. Cílem diplomové práce je navrhnout postupy detekce patogenů, které by toto splňovaly.

4. Metody

4.1. Odběr vzorků a izolace DNA

Vzorky pro detekci patogenů meruněk byly získány ze sadu v Lednici patřící Zahradnické fakultě Mendelovy univerzity v Brně. Byly odebrány vzorky lýka a vybrané listy *Prunus armeniaca*, odrůda Velkopavlovická. Vzorky pocházely z nemocných i bezpříznakových stromů. Mezi vybranými jedinci byl bezpříznakový strom (klon M.72A), dva stromy s částečnými příznaky napadení (klony VP.126 a M.44) a na první pohled napadený strom (klon K.2). Zvláštní důraz byl kladen na odběr bezpříznakových a napadených částí stromu v rámci jednoho klonu.

Odběr byl proveden ve třech termínech: 31. května 2010, 7. července 2010 a 3. listopadu 2010, vždy ze stejných stromů. Způsob odběru je znázorněn na *obrázku č. 16*. Vzorky byly uchovány při -70°C . Celkem bylo odebráno 39 vzorků.



Obrázek č. 16 Odběr lýka. Červenec 2011, Lednice, ČR.

Izolace DNA byla prováděna kitem PowerPlant® DNA Isolation Kit (Mo Bio, USA). Před samotným použitím kitu se meruňkové lýko homogenizovalo v třecí misce. Čistota izolované DNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji NanoPhotometer (Implen, Germany).

Po izolaci měla DNA vysokou míru kontaminace organickými látkami a docházelo k inhibici PCR (viz 5.3. Izolace a přečištění). Bylo nutné provést přečištění podle instrukcí v PowerPlant® DNA Isolation Kit (MoBio, USA).

4.2. Konstrukce primerů pro PCR

Pro design primerů byly použity volně dostupné programy a databáze. Templátové sekvence pro návrh primerů na identifikaci patogenů byly nalezeny pomocí databáze NCBI (NCBI online). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (Primer3 online). Specifita navržených primerů byla zkontrolována pomocí webové databáze BLAST (Altschul et al., 1990) a tvorba intermolekulárních a intramolekulárních struktur pomocí online programu OligoAnalyzer 3.1 (IDT online). Sekvence a charakteristiky primerů uvádí *tabulka č. 2* na následující straně.

Kód pro sekvence z databáze NCBI použité pro návrh primerů na identifikaci patogenů (NCBI online):

<i>Prunus armeniaca</i> :	FJ649670
<i>Candidatus phytoplasma prunorum</i> :	EF560639
<i>Monilinia laxa</i> :	AF506702
<i>Pseudomonas syringae</i> :	HM032080
<i>Cytospora cincta</i> :	EF447362
<i>Eutypa lata</i> :	DQ006942
<i>Verticillium dahliae</i> :	GQ336783

Tabulka č. 2

Organismus	Sekvence primeru	Tm	GC	Velikost
			poměr	amplikonu
<i>P. armeniaca</i>	FP: 5'- CGA GTC TTT GAA CGC AAG - 3'	54°C	50%	165 bp.
	RP: 5'- CCG AGG ACT TGG CAT TTA T - 3'	55°C	47,40%	
<i>M. laxa</i>	FP: 5'- CCG TAG GTA ATC GGC AAT AGG - 3'	60°C	52,38%	151 bp.
	RP: 5'- ATC CAC ACC GTC GAA CAA TAA - 3'	60°C	42,86%	
<i>C.P. prunorum</i>	FP: 5'- ATA AAA ATC AAT AAT GGC TTG G - 3'	55°C	27,27%	174 bp.
	RP: 5'- CGC CCT TAA TTT CTT TAA TTC - 3'	55°C	33,33%	
<i>P. syringae, pv. s.</i>	FP: 5'-TTG ATT CAT TGA AGA AGA CGA - 3'	54°C	33,30%	290 bp.
	RP: 5'-TGG AAT GCT CAT TTC TAA GC - 3'	54°C	40%	
<i>C. cincta</i>	FP: 5'- AAA CCC AGG GGA GGA CAG - 3'	58°C	61,10%	411 bp.
	RP: 5'- CAT AAG TTG GGG GTT TTA CGG - 3'	59°C	47,60%	
<i>V. dahliae</i>	FP: 5'- CTT CTG AGT GTT CTT AGC GAA CC - 3'	63°C	47,80%	289 bp.
	RP: 5'- CGA GCT GTA ATT ACT ACG CAA GG - 3'	63°C	47,80%	
<i>E. lata</i>	FP: 5'- CCT AAC TCC AAA CCC ATG TGA - 3'	59°C	47,60%	462 bp.
	RP: 5'- TCA GCC GTG ACA CAC CTA AA - 3'	58°C	50%	

Tabulka č. 2 Sekvence a charakteristiky navržených primerů použitých k identifikaci hledaných organismů. FP = přímý primer, RP = reverzní primer.

4.3. PCR

Hledané sekvence DNA byly amplifikované metodou PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Prunus armeniaca*. V tabulce č. 3 a 4 jsou uvedeny protokoly PCR pro amplifikaci DNA *Prunus armeniaca* a hledaných patogenů, reakční objemy pro jednu PCR zkumavku jsou uvedeny v tabulce č. 5. Pro účely diplomové práce byl použit termocykler Verity (Applied Biosystems, USA).

Tabulka č. 3		
	Teplota	Čas
1 x	95°C	2,5 min
50 x	95°C	20s
	55°C	20s
	72°C	30s
1 x	72°C	7 min
1 x	10°C	hold

Tabulka č. 3 PCR protokol pro *Prunus armeniaca*, *Candidatus phytoplasma prunorum* a *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*.

Tabulka č. 4		
	Teplota	Čas
1 x	95°C	2,5 min
50 x	95°C	20s
	60°C	20s
	72°C	30s
1 x	72°C	7 min
1 x	10°C	hold

Tabulka č. 4 PCR protokol pro *Monilinia laxa*, *Verticillium dahliae*, *Eutypa lata* a *Cytospora cincta*.

Tabulka č. 5

	Objem reaktantů pro detekci DNA <i>P. armeniaca</i>	Objem reaktantů pro detekci DNA patogenů
Master Mix	10 µl	10 µl
PCR voda	7,8 µl	6,3 µl
Přímý primer (c = 20 µM)	0,6 µl	0,6 µl
Reverzní primer (c = 20 µM)	0,6 µl	0,6 µl
Vzorek izolované DNA	1 µl	2,5 µl
Celkový objem	20 µl	20 µl

Tabulka č. 5 Objemy jedné zkumavky pro PCR reakci. Master Mix je směsí nukleotidů, Taq polymerázy, pufru udržujícího pH reakce a Mg^{+2} iontů nutných pro správnou funkci DNA polymerázy.

4.4. Elektroforéza na agarózovém gelu

Pro separaci DNA byl použit 1,5% agarózový gel, referenční látkou byl ethidium bromid (Tabulka č. 6). Vanička s gelem byla ponořena do 1x koncentrovaného TBE pufru (1l pufru \approx 1l destilované vody, 5,4g Tris, 2,75g kyseliny borité, 2ml 0,5M EDTA, pH=8). Vzorky DNA po PCR byly smíchané s nanášecím pufrem a do jamky v gelu bylo napipetováno 10µl směsi. Napětí zdroje bylo nastaveno na 100 V. Po skončení elektroforézy byly gely vyfoceny pod UV transiluminátorem.

Tabulka č.6

	V= cca 100ml
Agaróza	1,5 g
1x koncentrovaný TBE pufr	100 ml
Ethidium bromid	4,5 µl

Tabulka č. 6 Složení 1,5 agarózového gelu.

4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací

Jako templáty pro sekvenaci byly použity vybrané vzorky patogenů po PCR. Vzorky po PCR byly přečištěny alkalickou fosfatázou a exonukleázou I (*Tabulka č. 7*).

Tabulka č. 7	
	Objem
Alkalická fosfatáza	0,5 μ l
Exonukleáza I	1 μ l
Vzorek DNA	5 μ l
<hr/>	
Čas	Teplota
15 min	37°C
15 min	85°C

Tabulka č. 7 Protokol pro přečištění DNA templátu po PCR před sekvenační PCR.

4.6. Sekvenace

Pro potvrzení přítomnosti byly vzorky sekvenovány. Protokol PCR pro sekvenaci je v *tabulce č. 8*. Reakční objemy pro jednu zkumavku jsou v *tabulce č. 9*. Sekvenace byla prováděna pomocí sekvenčního kitu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA).

Tabulka č. 8		
	Teplota	Čas
1 x	95°C	60s
	95°C	20s
35 x	50°C	5s
	72°C	4min

Tabulka č. 8 Teplotní protokol pro sekvenční reakci provedenou pomocí BigDye Terminator v3.1 kitu.

	Reakční objem pro jednu PCR zkumavku
Sekvenační mix	2 µl
Sekvenační pufr	2 µl
Přímý primer	0,5 µl
Přečištěný vzorek DNA	2,5 µl
Voda	3 µl
Celkový objem	10 µl

Tabulka č. 9 Složení směsi pro PCR reakci za účelem sekvenace

Po skončení sekvenačního teplotního cyklu se DNA přečistila kitem Chemagic Seq Pure Kit firmy Chemagen dle přiloženého postupu, kdy byla provedena eluce do 15 ul PCR vody. Vlastní analýza sekvenční reakce byla provedena na přístroji GeneticAnalyzer 3100 (Applied Biosystems, USA) na 36 cm dlouhé kapiláře v polymeru POP7 za použití standardního protokolu nastaveného výrobcem. Sekvence byly vyhodnoceny programem Sequence Scanner (Applied Biosystems, USA) a sekvence porovnány s databázemi NCBI (NCBI online) programem BLAST (Altschul et al, 1990).

5. Výsledky

5.1. Návrh primerů

Podle postupu uvedeném v odstavci 2.9. Design primerů a 4.2. Konstrukce primerů pro PCR byly navrženy primery pro amplifikaci vybraných oblastí. Jako pozitivní kontrola amplifikace byla vybrána sekvence ITS oblastí ribozomálních genů *Prunus armeniaca*.

U patogenů *Candidatus phytoplasma prunorum*, *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*, *Cytospora cincta*, *Verticillium dahliae* a *Eutypa lata* byla pro návrh využita ITS sekvence ribozomálního genu (2.8. ITS oblasti). V případě patogenu *Monilinia laxa* byla na základě předešlých studií vybrána sekvence získaná RAPD analýzou (Côte et al., 2004). Specifita navržených primerů byla kontrolována prohledáváním komplementárních sekvencí uložených v rámci databáze NCBI (NCBI online) pomocí programu BLAST (Altshul et al., 1990).

5.2. Odběr vzorků

Tabulky č. 11A, č. 11B a č. 11C v této kapitole obsahují informace o odběru vzorků. V rámci testované skupiny byly vybrány stromy s různým stupněm napadením (kapitola 4.1. Odběr vzorků a izolace DNA). V *tabulce č. 10* je vývoj zdravotního stavu testovaných klonů stromů vyjádřený jako procentuální odumření koruny v roce 2009 a v roce 2010. Vzorky z prvního odběru z 31. května 2010 jsou označeny A, vzorky z druhého odběru 7. července 2010 jsou označeny B, vzorky z 3. listopadu 2010 jsou označeny C. Ve sloupci „Identita“, jsou vypsány vzorky, které byly odebrány přibližně ze stejného místa na větvi. V *tabulce č. 12* je uveden souhrn identity vzorků.

Klon	Odumření (v %)	
	Rok 2009	Rok 2010
K.2	40	100
VP.126	30	40
M.44	0	50
M.72A	0	0

Tabulka č. 10 Stav stromů z hlediska odhadnutého procentuálního odumření koruny v roce 2009 a v roce 2010.

První odběr vzorků byl proveden 31. května 2010 (*Tabulka č. 11A*). Byly vytipovány vhodné stromy *Prunus armeniaca* s ohledem na jejich zdravotní stav, který je uveden v tabulce 10. Vzorky z prvního sběru mají označení A.

Tabulka č. 11A				
Označení	Klon	Popis odběru a zdravotní stav	Věk větvě (roky)	Identita
1A	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	6	1B, 8C
2A	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	2	2B, 9C
3A	VP.126	lýko - odumírající větev	5	4B, 5C
4A	VP.126	lýko - odumírající větev	3	5B, 3C, 4C
5A	VP.126	lýko - odumírající větev	3	5B, 3C, 4C
6A	VP.126	lýko - zdravější větev	6	8B, 2C
7A	VP.126	lýko - zdravější větev	3	9B, 1C
8A	VP.126	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	6	7B
9A	VP.126	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	3	6B
10A	M.44	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	3	10B, 6C
11A	M.44	lýko - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	3	11B, 7C
12A	M.44	listy a řapíky - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	-	12B, 13B
13A	K.2	lýko - předčasné vadnutí listů i letorostů, odumírání	2	3B, 10C
14A	K.2	list - usychající list	-	-
15A	K.2	řapík	-	-

Tabulka č. 11A První odběr (A-vzorky), 31. května 2010.

Druhý odběr vzorků byl proveden 7. července 2010 (*Tabulka č. 11B*). Vzorky byly odebírány ze stejných stromů a větví jako první odběr a jsou označené jako B-vzorky.

Tabulka č. 11B

Označení	Klon	Popis odběru a zdravotní stav	Věk větve	
			(roky)	Identita
1B	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	6	1A, 8C
2B	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	2	2A, 9C
3B	K.2	lýko - předčasné vadnutí listů i letorostů, odumírání	2	13A, 10C
4B	VP.126	lýko - odumírající větev	5	3A, 5C
5B	VP.126	lýko - odumírající větev	3	4A, 3C, 4C
6B	VP.126	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	3	9A
7B	VP.126	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	6	8A
8B	VP.126	lýko - zdravější větev	6	6A, 2C
9B	VP.126	lýko - zdravější větev	3	7A, 1C
10B	M.44	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	3	10A, 6C
11B	M.44	lýko - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	3	11A, 7C
12B	M.44	listy a řapíky - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	-	12A
13B	M.44	listy a řapíky - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	-	12A

Tabulka č. 11B Druhý odběr vzorků (B - vzorky), 7. července 2010.

Třetí odběr vzorků byl proveden 3. listopadu 2010 (*Tabulka č. 11C*). Vzorky byly odebírány ze stejných stromů a větví jako první a druhý odběr a jsou označené jako C - vzorky.

Tabulka č. 11C				
Označení	Klon	Popis odběru a zdravotní stav	Věk větve	
			(roky)	Identita
1C	VP.126	lýko - zdravější větev	3	7A, 9B
2C	VP.126	lýko - zdravější větev	6	6A, 8B
3C	VP.126	lýko - odumírající větev	3	5A, 5B
4C	VP.126	lýko - odumírající větev	3	5A, 5B
5C	VP.126	lýko - odumírající větev	5	3A, 4B
6C	M.44	lýko - svinuté listy, mírná chloróza	3	10A, 10B
7C	M.44	lýko - svinuté listy, žloutenka, slabý růst	3	11A, 11B
8C	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	6	1A, 1B
9C	M.72A	lýko - bezpříznaková větev	2	2A, 2B
10C	K.2	lýko - předčasné vadnutí listů i letorostů	2	13A, 3B
11C	K.2	lýko - odumřelá větev (saprofytická houba)	-	-

Tabulka č. 11C Třetí odběr vzorků (C - vzorky), 3. listopadu 2010.

Tabulka č. 12 na následující straně uvádí souhrn *tabulek č. 11A, č. 11B a č. 11C*. Řádky představují data odběrů, sloupce obsahují označení vzorků, které byly odebírané přibližně ze stejného místa stromu. Symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném odběru tak chybí identita k ostatním odběrům. Nejčastější důvod proč nebyl vzorek odebrán je odumření sledované větve nebo části stromu. Popřípadě byly odebraným vzorkem listy, které se při třetím odběru 3. listopadu 2010 už na stromech nenacházely.

Tabulka č. 12

Datum odběru		Klon stromu a přítomnost patogenu									
		M.72A					VP.126				
31.5. 2010	Identita vzorků	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	
7.6.2010		1B	2B	4B	5B	5B	8B	9B	7B	6B	
3.11. 2010		8C	9C	5C	4C	3C	2C	1C	/	/	
		M.44					K.2				
31.5. 2010	Identita vzorků	10A	11A	12A	/	13A	14A	15A	/		
7.6.2010		10B	11B	12B	13B	3B	/	/	/		
3.11. 2010		6C	7C	/	/	10C	/	/	11C		

Tabulka č. 12 Souhrnná tabulka identity vzorků, identické vzorky ve sloupcích.

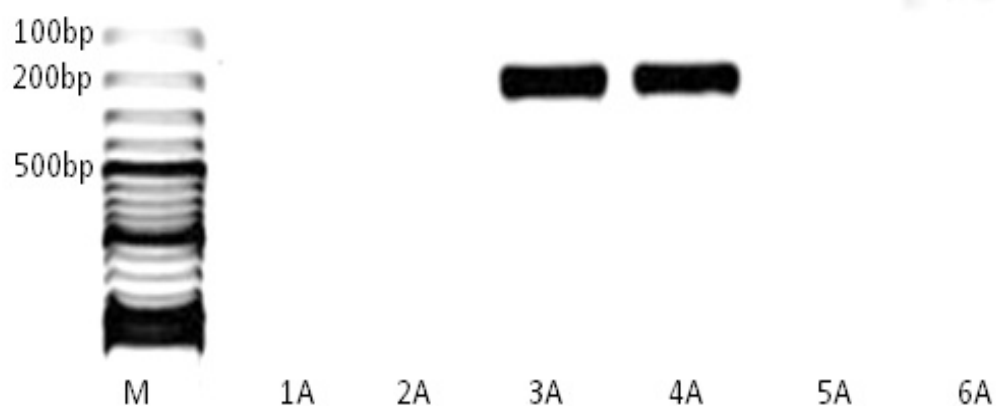
5.3 Izolace a přečištění

DNA byla ze vzorků izolována pomocí kitu PowerPlant® DNA Isolation Kit (MoBio, USA). Po izolaci byla čistota DNA měřena na přístroji NanoPhotometer (Implen, Germany), a to na základě dvou poměrů absorbancí, A260/280 a A260/230. Při provedení standardní izolace dle návodu u kitu byla získána poměrně nízká čistota DNA (Tabulka č. 13 – Před přečištěním). Následně byly provedeny testy na přítomnost pozitivní kontroly metodou PCR s navrženými primery pro amplifikaci *Prunus armeniaca*. Většina vzorků byla negativních (Obrázek č. 17) a bylo nutné provést přečištění podle instrukcí v PowerPlant® DNA Isolation Kit (MoBio, USA) Po přečištění se čistota vzorků měřená stejným způsobem zvýšila (Tabulka č. 13 – Po přečištění). Vzorky pak byly stejným způsobem otestovány na přítomnost pozitivní kontroly *Prunus armeniaca*. Všechny vzorky byly po přečištění pozitivní (Obrázek č. 18) a tento postup byl pak používán pro všechny následující izolace. Celkově bylo izolováno 39 vzorků.

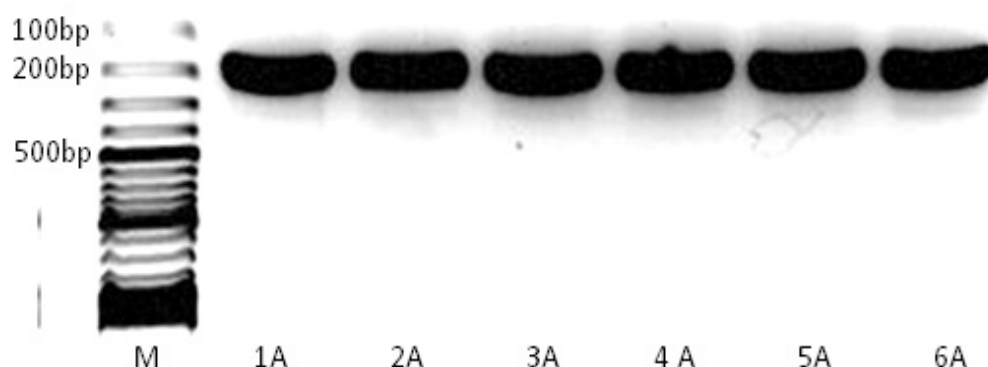
Tabulka č. 13

	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Koncentrace (ng/ μ l)
Před přečištěním	$1,33 \pm 0,41$ ($\alpha=0,05$)	$1,15 \pm 0,30$ ($\alpha=0,05$)	$4,2 \pm 0,8$ ($\alpha=0,05$)
Po přečištění	$1,62 \pm 0,32$ ($\alpha=0,05$)	$1,39 \pm 0,34$ ($\alpha=0,05$)	$3,7 \pm 0,6$ ($\alpha=0,05$)

Tabulka č. 13 Průměrné hodnoty čistoty vzorků DNA před přečištěním a po přečištění.



Obrázek č. 17 Analýza vzorků 1A - 6A před přečištěním na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuler 100 bp (Fermentas, Litva). Délka sekvence DNA ohraničená primery *Prunus armeniaca* byla 165bp. Pozitivní vzorky v dráze 3A a 4A. Ostatní negativní.



Obrázek č. 18 Analýza vzorků 1A - 6A po přečištění na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100bp (Fermentas, Litva). Délka sekvence DNA ohraničená primery *Prunus armeniaca* byla 165bp. Všechny vzorky pozitivní.

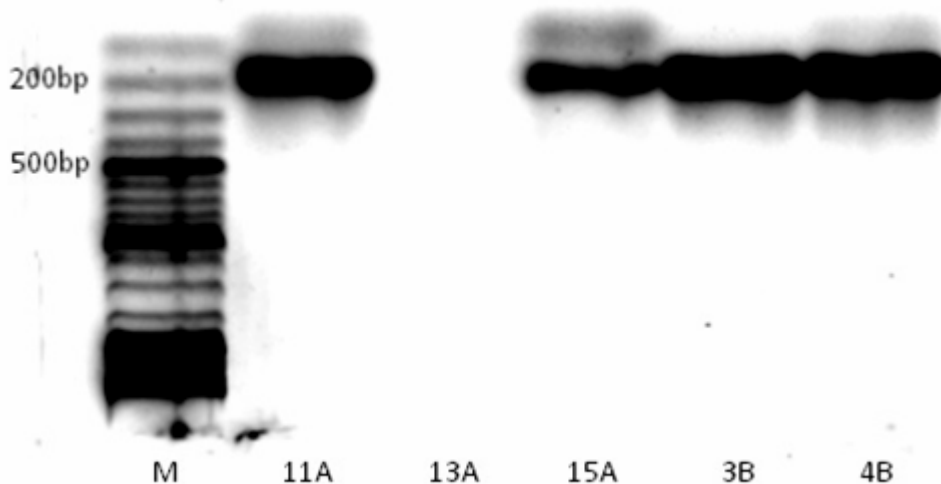
5.4. Identifikace a vyhodnocení přítomnosti patogenů

V této kapitole jsou uvedeny příklady postupů při vyhodnocování přítomnosti patogenů ve vzorcích a výsledné tabulky jejich přítomnosti. Vyhodnocení probíhalo na základě odečtu délek PCR produktů analyzovaných pomocí agarózového gelu a sekvenací vybraných vzorků podezřelých na přítomnost patogenu. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi v databázi NCBI (NCBI online) pomocí programu BLAST (Altshul et al., 1990).

5.4.1. *Candidatus phytoplasma prunorum*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Candidatus phytoplasma prunorum* ohraničená navrženými primery měla být 171bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy byl identifikován produkt o délce kolem 170 bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 19). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorku 12B (Tabulka č. 14). PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F- primeru pro identifikaci *C.P. prunorum* (5'- ATA AAA ATC AAT AAT GGC TTG G - 3') pomocí sekvenčního mixu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Po provedení byla získaná sekvence vyhodnocena

programem Sequence Scanner (Applied Biosystems, USA) a porovnána s referenční sekvencí *Candidatus phytoplasma prunorum* (EF560639, NCBI online), kdy byla nalezena 100% shoda (Tabulka č. 14). Sekvence tedy jednoznačně potvrdila specifitu detekce patogenu *Candidatus phytoplasma prunorum* u analyzovaných vzorků. Přítomnost patogenu ve všech vzorcích uvádí tabulka 15.



Obrázek č. 19 Analýza přítomnosti *C.P.prunorum* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelé vzorky na přítomnost patogenu jsou 11A, 15A, 3B a 4B. Teoretická délka amplifikátu je 171bp.

Tabulka č. 14

Vzorek 12B	AGCGTGAGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAATATTTATT
EF560639	AGCGTGAGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAATATTTATT

Vzorek 12B	TTAAAAAACAAGCTCTTTGAAAAGTAGATAAATTAAGGTTAGAAGAAT
EF560639	TTAAAAAACAAGCTCTTTGAAAAGTAGATAAATTAAGGTTAGAAGAAT

Tabulka č. 14 Srovnání sekvenace vzorku 12B se sekvencí EF560639 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et. al, 1994). Sekvence EF560639 byla použita pro navržení primerů na identifikaci *C. P. prunorum*. Shoda sekvencí je 100%.

Tabulka č. 15 uvádí celkovou přítomnost patogenu *Candidatus phytoplasma prunorum* ve všech odebraných vzorcích. Symbol + značí přítomnost, symbol – nepřítomnost, symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném sběru tak chybí identita. Modře jsou označeny sekvenované vzorky.

Tabulka č. 15										
Datum odběru	Patogen	Klon stromu a přítomnost patogenu								
		M.72A				VP.126				
31.5. 2010	<i>C. P. prunorum</i>	1A -	2A +	3A +	4A +	5A -	6A -	7A -	8A -	9A -
7.6.2010		1B +	2B +	4B +	5B -	5B -	8B +	9B +	7B -	6B +
3.11. 2010		8C -	9C -	5C -	4C -	3C -	2C +	1C -	/	/
		M.44				K.2				
31.5. 2010	<i>C.P. prunorum</i>	10A -	11A +	12A +	/	13A -	14A -	15A +	/	
7.6.2010		10B -	11B +	12B +	13B +	3B +	/	/	/	
3.11. 2010		6C -	7C +	/	/	10C +	/	/	11C -	

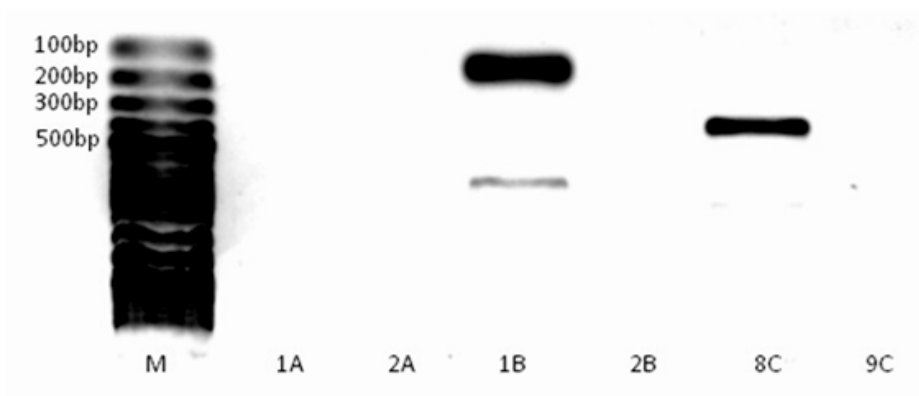
Tabulka č. 15. Vyhodnocení přítomnosti patogenu *Candidatus phytoplasma prunorum* ve všech odebraných vzorcích.

5.4.2. *Monilinia laxa*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Monilinia laxa* ohraničená navrženými primery měla být 151bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy byl identifikován produkt o délce kolem 150 bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 20). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorku 13A (Tabulka č. 16). PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F - primeru pro identifikaci *Monilinia laxa*

(5' - CCG TAG GTA ATC GGC AAT AGG - 3') pomocí sekvenčního mixu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Po provedení byla získaná sekvence vyhodnocena programem Sequence Scanner (Applied Biosystems) a porovnána s referenční sekvencí *Monilinia laxa* (AF506702, NCBI online), kdy byla nalezena 100% shoda (Tabulka č. 16). Sekvence tedy jednoznačně potvrdila specifitu detekce patogenu *Monilinia laxa* u analyzovaných vzorků.

V agarózových gelech se velmi často nacházely pruhy zhruba v 300bp (Obrázek č. 20, vzorek 8C). Sekvenací se potvrdilo, že se jedná o *Monilinia laxa*. Vysvětlení je uvedeno v kapitole 6. Diskuze (Tabulka č. 32). *M. laxa* byla tedy z agarózového gelu odečítána jak v 151bp, tak zhruba při 300bp. Přítomnost patogenu ve všech vzorcích uvádí tabulka č. 17.



Obrázek č. 20 Analýza přítomnosti *M. laxa* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelý vzorek na přítomnost patogenu je 1B.

Tabulka č. 16

Vzorek 13A	AGAAGGGCGGTTGAGAAGGTTAAGGGTTTGCTACTTGCACTCCTTTTATT
AF506702	AGAAGGGCGGTTGAGAAGGTTAAGGGTTTGCTACTTGCACTCCTTTTATT

Vzorek 13A	GTTCGACGGTGTGGAT
AF506702	GTTCGACGGTGTGGAT

Tabulka č. 16 Srovnání sekvenace vzorku 13A se sekvencí AF506702 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W. (Thompson et. al, 1994) Sekvence AF5067029 byla použita pro navržení primerů na identifikaci *M.laxa*. Shoda sekvencí je 100%.

Tabulka č. 17 uvádí celkovou přítomnost patogenu *Monilinia laxa* ve všech odebraných vzorcích. Symbol + značí přítomnost, symbol – nepřítomnost, symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném sběru tak chybí identita. Modře jsou označeny sekvenované vzorky.

Tabulka č. 17										
Datum odběru	Patogen	Klon stromu a přítomnost patogenu								
		M.72A				VP.126				
31.5. 2010	<i>M. laxa</i>	1A -	2A -	3A -	4A -	5A -	6A -	7A -	8A -	9A -
7.6.2010		1B +	2B -	4B -	5B -	5B -	8B +	9B +	7B +	6B +
3.11. 2010		8C +	9C -	5C -	4C -	3C +	2C +	1C +	/	/
		M.44				K.2				
31.5. 2010	<i>M. laxa</i>	10A +	11A +	12A +	/	13A +	14A +	15A +	/	
7.6.2010		10B +	11B +	12B +	13B -	3B +	/	/	/	
3.11. 2010		6C +	7C +	/	/	10C -	/	/	11C -	

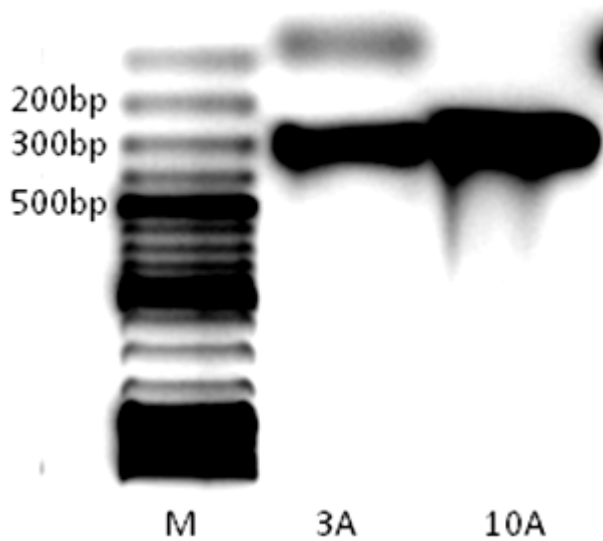
Tabulka č. 17. Vyhodnocení přítomnosti patogenu *Monilinia laxa* ve všech odebraných vzorcích.

5.4.3. *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* ohraničená navrženými primery měla být 290bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy byl identifikován produkt o délce kolem 300 bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 21). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorku 2A (Tabulka č. 18). PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F - primeru pro identifikaci *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* (5'-TTG ATT CAT TGA AGA AGA CGA – 3') pomocí sekvenčního mixu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Po provedení byla získaná sekvence vyhodnocena programem Sequence Scanner (Applied Biosystems, USA) a porovnána s referenční sekvencí *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* (HM032080, NCBI online), kdy byla nalezena 100% shoda (Tabulka č. 18).

Dále byla provedena sekvenace vzorku 3B, která se neshodovala se sekvencí *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*. Pomocí programu BLAST (Altshul et al., 1990) byla nalezena 100% shoda se sekvencí AY582373, která odpovídá organismu *Pseudomonas fluorescens* (Tabulka č. 19).

Srovnání získaných sekvencí *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* a *Pseudomonas fluorescens* uvádí tabulka č. 20. Srovnání shody sekvence navržených primerů pro identifikaci *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* se sekvencí *Pseudomonas fluorescens* je v tabulce č. 21 a ukazuje na 100% shodu F i R primerů. Z důvodu nespecifické detekce není souhrnná tabulka přítomnosti patogenu *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* ve vzorcích v kapitole uvedena.



Obrázek č. 21 Analýza přítomnosti *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelé vzorky na přítomnost patogenu 3A a 10A.

Tabulka č. 18

Vzorek 2A	GTAGAAATACGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGC
HM032080	GTAGAAATACGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGC

Vzorek 2A	AGGAGGTCAACGGTTCGATCCCGTTTGGCTCCACCAT
HM032080	AGGAGGTCAACGGTTCGATCCCGTTTGGCTCCACCAT

Tabulka č. 18 Srovnání sekvenace vzorku 2A se sekvencí HM032080 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et. al, 1994). Sekvence HM032080 byla použita pro navržení primerů na identifikaci *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*. Shoda sekvencí je 100%

Tabulka č. 19

Vzorek 3B AY582373	ACCAATTTTGTGTGGGAAACGCCTGTAGAAATACGGGGCC ACCAATTTTGTGTGGGAAACGCCTGTAGAAATACGGGGCC *****
Vzorek 3B AY582373	ATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTACGCAGGAGGTCAACGG ATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTACGCAGGAGGTCAACGG *****
Vzorek 3B AY582373	TTCGATCCCGTTTGGCTCCACCAT TTCGATCCCGTTTGGCTCCACCAT *****

Tabulka č. 19 Srovnání sekvenace vzorku 3B se sekvencí AY582373 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Sekvence AY582373 je sekvencí ITS oblasti organismu *Pseudomonas fluorescens*. Shoda sekvencí je 100%.

Tabulka č. 20

Vzorek 2A (<i>P.syringae</i> , <i>pv.syringae</i>) Vzorek 3B (<i>P. fluorescens</i>)	CCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCA G CGG CCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCA A CGG *****
Vzorek 2A (<i>P.syringae</i> , <i>pv.syringae</i>) Vzorek 3B (<i>P. fluorescens</i>)	TTCGATCCCG G TGGCTCCACCA TTCGATCCCG T TGGCTCCACCA *****

Tabulka č. 20 Srovnání sekvenace vzorku 2A a 3B porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et. al, 1994). Sekvence 2A je sekvencí organismu *P. syringae*, *pv. syringae*, 3B je sekvencí organismu *Pseudomonas fluorescens*. Barevně jsou vyznačené neshody sekvencí.

Tabulka č. 21

F - primer (<i>P. syringae</i> , pv. <i>syringae</i>) AY582373 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	TTGATTCATTGAAGAAGACGA TTGATTCATTGAAGAAGACGA *****
R – primer (<i>P. syringae</i> , pv. <i>syringae</i>) HQ171972 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	GCTTAGAAATGAGCATTCCA GCTTAGAAATGAGCATTCCA *****

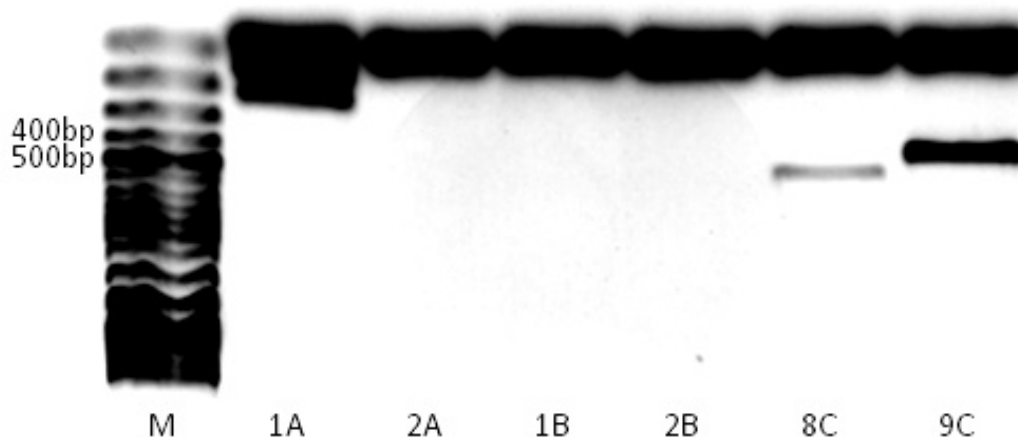
Tabulka č. 21 Srovnání sekvence F - primeru *P.syringae*, pv. *syringae* se sekvencí AY582373 (NCBI online, ITS oblast *Pseudomonas fluorescens*) a R-primeru *P.syringae*, pv. *syringae* se sekvencí HQ171972 (NCBI online, ITS oblast *Pseudomonas fluorescens*). Shoda obou primerů s uvedenými sekvencemi *Pseudomonas fluorescens* je 100%.

5.4.4. *Cytospora cincta*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Cytospora cincta* ohraničená navrženými primery měla být 411bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy byl identifikován produkt o délce kolem 400bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 22). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorku 7C (Tabulka č. 22). PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F - primeru pro identifikaci *Cytospora cincta* (5' - AAA CCC AGG GGA GGA CAG - 3') pomocí BigDye Terminator v3.1 mixu (AppliedBiosystems, USA). Po provedení sekvenace byla získaná sekvence vyhodnocena programem Sequence Scanner (Applied Biosystems, USA) a porovnána s referenční sekvencí *Cytospora cincta* (EF447362, NCBI online), kdy byla nalezena 100% shoda (Tabulka č. 22).

Dále byla provedena sekvenace vzorku 13A, která se neshodovala se sekvencí *Cytospora cincta*. Pomocí programu BLAST (Altshul et al., 1990) byla nalezena 100% shoda se sekvencí EF447376, která odpovídá organismu *Leucostoma personi* (Tabulka č. 23). Srovnání získaných sekvencí *Cytospora cincta* a *Leucostoma personi* uvádí tabulka č. 24. Srovnání shody sekvence navržených primerů pro identifikaci *Cytospora cincta* se sekvencí *Leucostoma personi* je v tabulce č. 25 a ukazuje odlišnost primerů. Souhrn přítomnosti

patogenu *Cytospora cincta* ve vzorcích uvádí *tabulka č. 26*, možné komplikace detekce jsou diskutovány v kapitole 6.



Obrázek č. 22 Analýza přítomnosti *Cytospora cincta* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelý vzorek na přítomnost patogenu je 9C.

Tabulka č. 22

Vzorek 7C EF447362 (<i>C. cincta</i>)	GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGTGGGG GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGTGGGG *****
Vzorek 7C EF447362 (<i>C. cincta</i>)	CATTACCTGACTGTTTTCAACAGGAGGGTAAGCCCTGAAAT CATTACCTGACTGTTTTCAACAGGAGGGTAAGCCCTGAAAT *****
Vzorek 7C EF447362 (<i>C. cincta</i>)	TTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAA TTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAA *****
Vzorek 7C EF447362 (<i>C. cincta</i>)	CCCTCGCTCTGGACTGTACTGGCGCGGCCCTGCCGTA AAC CCCTCGCTCTGGACTGTACTGGCGCGGCCCTGCCGTA AAC *****

Tabulka č. 22 Srovnání sekvenace vzorku 7C se sekvencí EF447362 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et. al, 1994). Sekvence EF447362 byla použita pro navržení primerů na identifikaci *Cytospora cincta*. Shoda sekvencí je 100%

Tabulka č. 23

Vzorek 13A EF447376 (<i>L. persooni</i>)	GGTATTCCAGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT GGTATTCCAGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCT *****
Vzorek 13A EF447376 (<i>L. persooni</i>)	CAAGCCTAGCTTGGTGTTGGGGCATTACCTGACTGTTTTACAG CAAGCCTAGCTTGGTGTTGGGGCATTACCTGACTGTTTTACAG *****
Vzorek 13A EF447376 (<i>L. persooni</i>)	GAGGGTAAGCCCTGAAATTTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACTCC GAGGGTAAGCCCTGAAATTTAGTGGCGAGCTCGCCAGGACTCC *****
Vzorek 13A EF447376 (<i>L. persooni</i>)	GAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGCTTTGGATAGTACTGGCGCGG GAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGCTTTGGATAGTACTGGCGCGG *****
Vzorek 13A EF447376 (<i>L. persooni</i>)	CCCTGCCGTAAAAC CCCTGCCGTAAAAC *****

Tabulka č. 23 Srovnání sekvenace vzorku 13A se sekvencí EF447376 (NCBI online) porovnané programem CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). EF447376 je sekvencí organismu *Leucostoma persooni*. Shoda sekvencí je 100%.

Tabulka č. 24

Vzorek 7C (<i>C. cincta</i>) Vzorek 13A (<i>L. persooni</i>)	GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGTTGGGGCAT GAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTAGCTTGGTGTTGGGGCAT *****
Vzorek 7C (<i>C. cincta</i>) Vzorek 13A (<i>L. persooni</i>)	TACCTGACTGTTTTCAACAGGAGGGTAAGCCCTGAAATTTAGT TACCTGACTGTTTT--ACAGGAGGGTAAGCCCTGAAATTTAGT *****
Vzorek 7C (<i>C. cincta</i>) Vzorek 13A (<i>L. persooni</i>)	GGCGAGCTCGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGC GGCGAGCTCGCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCTCGC *****
Vzorek 7C (<i>C. cincta</i>) Vzorek 13A (<i>L. persooni</i>)	TCTGGACTGTACTGGCGCGGCCCTGC TTTGGATAGTACTGGCGCGGCCCTGC * **** * *****

Tabulka č. 24 Srovnání sekvenace vzorků 7C a 13A s vyznačenými. (Thompson et al., 1994)

Tabulka č. 25

F - primer (<i>Cytospora cincta</i>) EF447376 (<i>Leucostoma persooni</i>)	AAACCCAGGGGAGGACAG AACGCCAGGGGAGGACAG *** *****
R - primer (<i>Cytospora cincta</i>) HM061320 (<i>Leucostoma persooni</i>)	CATAAGTTGGGGTTTTACGG CAGAAGTTGGGGTTTTACGG ** *****

Tabulka č. 25 Srovnání sekvence F - primeru *Cytospora cincta* se sekvencí EF447376 (NCBI online, ITS oblast *Leucostoma persooni*) a R-primeru *Cytospora cincta* se sekvencí HM061320 (NCBI online, ITS oblast *Leucostoma persooni*) programem CLUSTAL W (Thompson et. al, 1994). Shoda obou primerů s uvedenými sekvencemi *Leucostoma persooni* je vysoká, nicméně ne 100%.

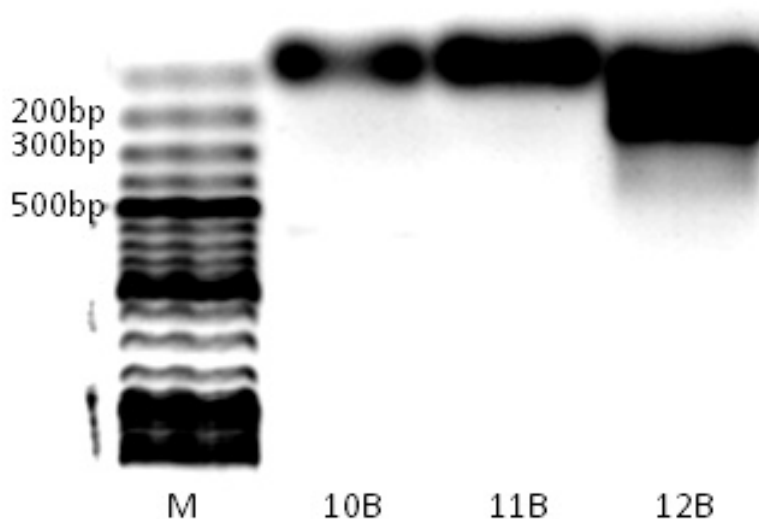
Tabulka č. 26 uvádí celkovou přítomnost patogenu *Cytospora cincta* (eventuelně *L. personi* – viz kap. 6. Diskuze) ve všech odebraných vzorcích. Symbol + značí přítomnost, symbol - nepřítomnost, symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném sběru tak chybí identita. Modře jsou označeny sekvenované vzorky.

Tabulka č. 26										
Datum odběru	Patogen	Klon stromu a přítomnost patogenu								
		M.72A				VP.126				
31.5. 2010	<i>C. cincta</i>	1A -	2A -	3A -	4A -	5A -	6A -	7A -	8A -	9A -
7.6.2010		1B -	2B -	4B +	5B +	5B +	8B +	9B +	7B +	6B +
3.11. 2010		8C +	9C +	5C +	4C -	3C +	2C +	1C -	/	/
		M.44				K.2				
31.5. 2010	<i>C. cincta</i>	10A -	11A +	12A -	/	13A +	14A +	15A +	/	
7.6.2010		10B +	11B +	12B +	13B +	3B +	/	/	/	
3.11. 2010		6C +	7C +	/	/	10C +	/	/	11C +	

Tabulka č. 26 Vyhodnocení přítomnosti patogenu *Cytospora cincta* v odebraných vzorcích.

5.4.5. *Verticillium dahliae*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Verticillium dahliae* ohraničená navrženými primery měla být 289bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy byl identifikován produkt o délce kolem 250bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 23). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorků. PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F-primeru pro identifikaci *Verticillium dahliae* (5'- CTT CTG AGT GTT CTT AGC GAA CC - 3') pomocí sekvenčního mixu BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Bohužel výsledné sekvenace nebylo možné vyhodnotit, pravděpodobně z důvodu přítomnosti více PCR produktů. Četnost přítomnosti *V. dahliae* zjištěná na základě agarózové elektroforézy je nicméně velmi nízká. V tabulce přítomnosti *V. dahliae* (Tabulka č. 27) jsou vyhodnoceny jen vzorky, u nichž je jistota, že neobsahují DNA *V. dahliae*. U vzorků, kde nemáme 100% jistotu nepřítomnosti, je uveden symbol otazníku (?).



Obrázek č. 23 Analýza přítomnosti *Verticillium dahliae* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelý vzorek na přítomnost patogenu je 12B.

Tabulka 27 uvádí celkovou přítomnost patogenu *Verticillium dahliae* ve všech odebraných vzorcích. Symbol – značí nepřítomnost patogenu, symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném sběru tak chybí identita. Symbol ? znamená, že nemůžeme rozhodnout o nepřítomnosti *V. dahliae* ve vzorku. Modře jsou označeny sekvenované vzorky.

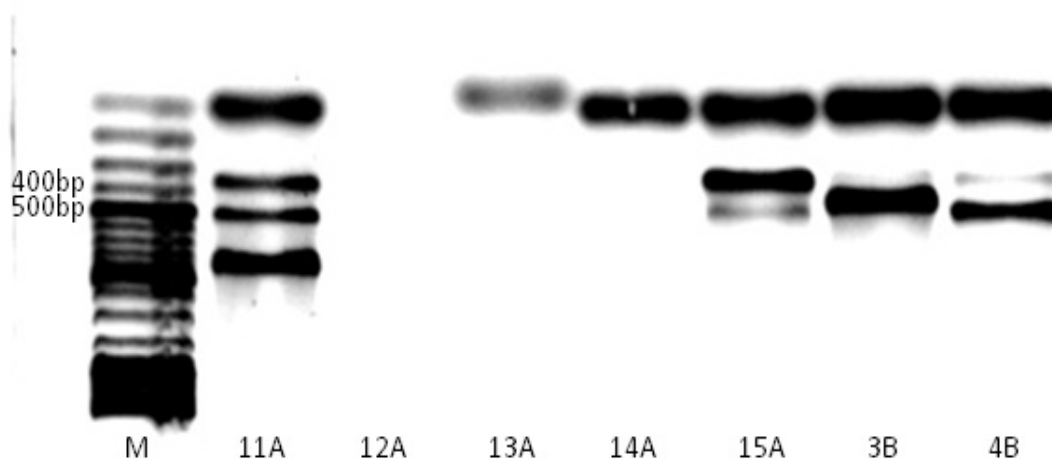
Tabulka č. 27										
Datum odběru	Patogen	Klon stromu a přítomnost patogenu								
		M.72A				VP.126				
31.5. 2010		1A -	2A -	3A -	4A -	5A -	6A -	7A -	8A -	9A -
7.6.2010	<i>V. dahliae</i>	1B -	2B - ?	4B -	5B -	5B -	8B -	9B -	7B -	6B -
3.11. 2010		8C -	9C -	5C -	4C -	3C ?	2C ?	1C -	/	/
		M.44				K.2				
31.5. 2010		10A -	11A -	12A -	/	13A -	14A -	15A ?	/	/
7.6.2010	<i>V. dahliae</i>	10B -	11B -	12B ?	13B ?	3B -	/	/	/	/
3.11. 2010		6C ?	7C -	/	/	10C -	/	/	/	11C ?

Tabulka č. 27. Vyhodnocení přítomnosti patogenu *V. dahliae* ve všech odebraných vzorcích.

5.4.6. *Eutypa lata*

Teoretická délka amplifikované ITS oblasti patogenu *Eutypa lata* ohraničená navrženými primery měla být 462bp. Po provedení PCR reakce a elektroforézy bylo identifikováno několik produktů o délce kolem 400 - 500bp odpovídající teoretickému předpokladu (Obrázek č. 24). Po amplifikaci všech 39 zkoumaných vzorků byla pro potvrzení specifity produktu provedena kontrolní sekvenace vzorku 6B (Tabulka č. 28). PCR produkt byl přečištěn směsí exonukleázy 1 a alkalické fosfatázy (4.5. Přečištění PCR produktu před sekvenací) a sekvenován za použití F - primeru pro identifikaci *Eutypa lata* (5' - CCT AAC TCC AAA CCC ATG TGA - 3') pomocí sekvenčního mixu BigDye Terminator v3.1

(Applied Biosystems, USA). Po provedení byla získaná sekvence porovnána programem Sequence Scanner (Applied Biosystems, USA) a vyhodnocena programem BLAST (Altshul et al., 1990). Nebyla nalezena žádná shoda s referenční sekvencí *Eutypa lata* (EF447362, NCBI online) ani s žádným jiným organismem. Sekvence byla opakována s dalšími vzorky (např. 7B – tabulka č. 29 a 10B – tabulka č. 30), ale se stejným výsledkem. V tabulce č. 31 je vyhodnocena celková přítomnost patogenu *Eutypa lata* ve vzorcích.



Obrázek č. 24 Analýza přítomnosti *Eutypa lata* na 1.5% agarózovém gelu za použití délkového markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Litva). Podezřelé vzorky na přítomnost patogenu jsou 11A, 3B a 4B.

Tabulka č. 28

Vzorek 10B	ACCGACTATGGGTTACAGATGGTGATGGTAGGCAACAACAG CGATGGCAGACGGCGACGACAGTCGGTGTCAGCTACAAGAG ACCACCATGGCGATTGAAGCTGTTCCACTATTTAT
------------	---

Tabulka č. 28 Sekvenci vzorku 10B vyhodnotil BLAST jako neznámou. (Altshul et al., 1990)

Tabulka č. 29

Vzorek 7B	CTTTTGCCTCTCTCTCAAGTTTGTGGATGATGATTTT GGTGTGGGCTGTGGATT
-----------	--

Tabulka č. 29 Sekvenci vzorku 7B vyhodnotil BLAST jako neznámou. (Altshul et al., 1990)

Tabulka č. 30

Vzorek 6B	TTTGAAAACTGTATGCCGTGAGGCCACCACTCACGGAT CTTTACATCCGTGTCGTGTCTGTGAATGGTAG
-----------	--

Tabulka č. 30 Sekvenci vzorku 6B vyhodnotil BLAST jako neznámou (Altshul et al., 1990)

Tabulka č. 31 uvádí celkovou přítomnost patogenu *Eutypa lata* ve všech odebraných vzorcích. Symbol značí – nepřítomnost, symbol / znamená, že vzorek nebyl odebrán a v daném sběru tak chybí identita. Modře jsou označeny sekvenované vzorky.

Tabulka č. 31

Datum odběru	Patogen	Klon stromu a přítomnost patogenu									
		M.72A					VP.126				
31.5. 2010	<i>E. lata</i>	1A -	2A -	3A -	4A -	5A -	6A -	7A -	8A -	9A -	
7.6.2010		1B -	2B -	4B -	5B -	5B -	8B -	9B -	7B -	6B -	
3.11. 2010		8C -	9C -	5C -	4C -	3C -	2C -	1C -	/	/	
		M.44					K.2				
31.5. 2010	<i>E. lata</i>	10A -	11A -	12A -	/	13A -	14A -	15A -	/	/	
7.6.2010		10B -	11B -	12B -	13B -	3B -	/	/	/		
3.11. 2010		6C -	7C -	/	/	10C -	/	/	11C -		

Tabulka č. 31 Vyhodnocení přítomnosti patogenu *Eutypa lata* ve všech odebraných vzorcích.

6. Diskuze

Meruňka obecná je choulostivá k napadení mnoha chorobami s různým fylogenetickým zařazením. Mezi jedny z nejvýznamnějších patří moniliniový úžeh a hniloba způsobené houbou *Monilinia laxa*, nemoc ESFY způsobená fytoplazmou *Candidatus phytoplasma prunorum*, mrtvice meruněk (bakterie *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*, houba *Cytospora cincta*), verticiliové vadnutí (houba *Verticillium dahliae*) nebo eutypióza (houba *Eutypa lata*). Správnou a včasnou diagnostikou lze předcházet ekonomickým ztrátám způsobených atakem zmíněných patogenů. V diplomové práci jsme se zabývali vývojem diagnostických metod, které by tyto nároky splňovaly.

Odběr vzorků probíhal ve třech termínech. Vybrali jsme termín na začátku vegetačního období 31. května 2010, na vrcholu 7. července 2010 a v závěru 3. listopadu 2010 a srovnávali jsme výskyt patogenů v různých vegetačních obdobích. Odběr byl prováděn z bezpříznakových i napadených klonů stromů. Ze vzorků byla izolována DNA a navrženými primery byla provedena PCR. Nezanedbatelnou komplikací byla skutečnost, že jsme neměli k dispozici čisté kultury hledaných patogenů použitelné jako pozitivní kontrola při zavádění metod PCR pro jejich detekci. Z tohoto důvodu byly vzorky podezřelé na přítomnost patogenu sekvenovány a sekvence porovnány s referenčními sekvencemi v databázi NCBI (NCBI online). Z výsledků byla zkoumána přítomnost patogenů v jednotlivých napadených i bezpříznakových větvích a stromech, vývoj zdravotního stavu klonů stromů nebo korelace výskytu patogenů.

Candidatus phytoplasma prunorum

Nejvyšší četnost výskytu *C.P. prunorum* jsme zaznamenali ve druhém sběru. Menší četnost u prvního sběru si vysvětlujeme tím, že se patogen ještě nestačil plně rozvinout. Menší četnost ve třetím sběru lze poté vysvětlit jednak nehomogenním odběrem vzorku z větví. A jednak možnou kompeticí patogenů mezi sebou.

V literatuře je popsána kompetice *Cytospora cincta* a *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*. *Cytospora cincta* acidifikuje prostředí až do pH kolem 3,8 (Endert – Kirkpatrick, et al., 1987) a zatímco *C. cincta* byla podle studie izolována ve sběrech během celého vegetačního období, četnost *P. syringae*, pv. *syringae* s postupem času klesala. Může za to

právě vysoká kyselost prostředí způsobená *C. cincta*, která je pro *P. syringae*, pv. *syringae* latentní. Jelikož četnost *Cytospora cincta* zejména v druhém a třetím odběru byla vysoká, existuje zde podezření, že vysoká acidita prostředí může mít letální vliv i na bakterii *Candidatus phytoplasma prunorum*, čímž by se právě vysvětlovala její snížená přítomnost ve třetím sběru.

Samotná identifikace přítomnosti *C.P. prunorum* je ale poměrně jasná. V agarózových gelech se nacházely teoreticky předpokládané amplifikáty a sekvenací se potvrdila přítomnost patogenu. Vývoj metody detekce *C.P. prunorum* byl tedy úspěšný.

Monilinia laxa

Teoretická velikost amplifikátu *Monilinia laxa* byla 151bp. V agarózových gelech se ale často vyskytovaly pruhy s velikostí okolo 300bp. Podrobným zkoumáním sekvence vzorku 13A (u kterého byl pozorován amplikon zhruba v 300kb) vyšlo najevo, že se sekvence ohraničená primery vyskytuje v genomu *M. laxa* v repetici, pravděpodobně 2x. Důkaz pro toto tvrzení poskytuje *tabulka č. 32*. Sekvence vzorku 13A mezi 59bp - 102bp je shodná se sekvencí 167bp - 210bp. Teoretický transkript ohraničený primery měl 151bp, při repetici 302bp. *M. laxa* byla tedy z agarózového gelu odečítána jak v 151bp, tak při 302bp. Kontrolní sekvenace potvrdily specifitu detekce.

Tabulka č. 32

Vzorek 13A

```
59bp  TGAGAAGGTTAAGGGTTTGCTACTTGCACTCCTTTTATTGTTTC  102bp
167bp TGAGAAGGTTAAGGGTTTGCTACTTGCACTCCTTTTATTGTTTC  210bp
*****
```

Tabulka č. 32 Shoda sekvence vzorku 13A mezi 59bp - 102bp a 167bp - 210bp.

Přítomnost *Monilinia laxa* ve vzorcích je v prvních odběrech nízká, v dalších odběrech se ale četnost výskytu zvyšuje. Kromě klonu stromu K.2, který byl v době třetího odběru již odumřelý a nebylo možné odebrat zelené lýko, nepozorujeme žádné vymizení patogenu

mezi odběry. S ohledem na potvrzení výskytu patogenu sekvenací můžeme prohlásit, že se podařilo vypracovat spolehlivou metodu identifikace *Monilina laxa* ve vzorku.

Pseudomonas syringae*, pv. *syringae

Přítomnost *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*, potvrdila sekvenace několika vzorků. Mnohem více sekvenovaných vzorků ale představovalo sekvence *Pseudomonas fluorescens*, který je velice běžný nepatogenní organismus a dokonce má na rostliny protektivní účinky (Shalini; Srivastava, 2008). Navržené primery jsou shodné pro oba organismy (tab. 21). Rozlišit zmíněné organismy pouhou agarózovou elektroforézou je tedy téměř nemožné. Teoretická velikost amplifikátu je sice poněkud odlišná (*P. syringae*, pv. *syringae* = 290bp, *P. fluorescens* = 245bp), ale jasné potvrzení pomocí sekvenace je velmi problematické. Nejčastější výsledek sekvenace byly totiž pravděpodobně mixy obou patogenů, i když s výraznou převahou *P. fluorescens*. Problém by vyřešily nově navržené vnitřní primery do míst odlišností obou sekvencí, například do míst, které uvádí tabulka 20.

Cytospora cincta

Organismus *C. cincta* byl ze všech patogenů nejčastěji sekvenován. U naprosté většiny vzorků se potvrdila jasná přítomnost *Cytospora cincta*. Objevily se ale i sekvence, které naznačovaly, že společně s *C. cincta* se ve vzorku nachází i jiný patogen, *Leucostoma perooni*. *Leucostoma perooni* je příbuzný patogen *Cytospora cincta*, má podobné hostitele i patologické projevy (Adams et al., 1990). Je obtížné odlišit oba patogeny v agarózovém gelu, teoretická délka PCR amplifikátu je u *C. cincta* 411bp, u *L. perooni* 409bp. Sekvenací PCR produktu lze patogeny odlišit, ovšem nelze s jistotou učít, že se ve vzorku nenachází oba dva. Pro přesné rozlišení by bylo řešením, stejně jako u *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae*, navrhnout vnitřní primery do nehomologních míst patogenů uvedených v tabulce č. 24.

Protože se *C. cincta* nacházela v naprosté většině sekvenací jako dominantní patogen nad *Leucostoma perooni* a také protože mají oba organismy podobné patogenní charakteristiky, byla přítomnost *C. cincta* vyhodnocena. *Cytospora cincta* patří spolu s *M. laxa* a *C. P. prunorum* mezi tři nejčtenější patogeny identifikované v rámci diplomové práce. Stoprocentní přítomnost byla vyhodnocena u klonu K.2 (odumřelý strom) a vysoká

u stromů VP.126 a M.44 (zdravé i odumřelé větve). Naopak u bezpříznakového stromu M.72A byla přítomnost zjištěna až v posledním sběru 3. listopadu 2010. Podle literatury se *C. cincta* šíří mimo vegetační období. Ve vegetačním období, kdy má strom aktivované hojivé pletivo kalus, se rozšiřování omezuje. Obnoví se až s dalším klidovým obdobím stromu (Biggs et al., 2005). To by vysvětlovalo identifikaci patogenu u klonu M.72A pouze v posledním sběru. Bylo by tedy zajímavé sledovat další vývoj zdravotního stavu bezpříznakového stromu M.72A.

Fakt, že se patogen *C. cincta* nacházel u odumřelého (K.2 – odumření 100%) nebo prokazatelně napadených stromů (M.44 – odumření koruny 50%, VP.126 - odumření koruny 40%) ve velké četnosti, naproti tomu u pozitivní kontroly M.72A jen u třetího odběru vede k závěrům, že *Cytospora cincta* je patogen zodpovědný za největší škody na testovaných stromech.

Verticilium dahliae

Přítomnost *Verticilium dahliae* v testovaných vzorcích byla malá. Bohužel nemůžeme s jistotou říci, že je nulová, protože z provedených sekvenací nebylo možné odečíst sekvenci nukleotidů. Nejistota přítomnosti se ovšem týká pouze 8 vzorků z celkových 39 odebraných, u ostatních 31 vzorků máme jistotu nepřítomnosti *V. dahliae*.

Eutypa lata

Teoretická délka amplifikátu vymezená primery pro detekci *Eutypa lata* byla 462bp. V agarózovém gelu se amplifikáty podobné velikosti nacházely, ovšem jejich sekvence přítomnost *Eutypa lata* nepotvrdila. Sekvence dokonce neměly shodu ani s žádným organismem v databázi NCBI. Přítomnost patogenu je tedy vyloučena.

Shrnutí diskuze

Výsledky ukázaly zejména to, že identifikace patogenu založená pouze na patologických projevech je tedy nedostatečná. Patogeny byly nalezeny jak v napadených, tak i v zdánlivě zdravých stromech nebo částech stromů. Pro potvrzení úspěšnosti

navržených diagnostických metod by bylo na místě sledování vývoje patologických projevů, které dříve nebyly rozpoznatelné. Zejména pak u bezpříznakového stromu M.72A.

7. Souhrn

Patogeny napadající meruňky jsou poměrně početné a fylogeneticky různorodé, jimi způsobené nemoci mají však často podobné symptomy. Pro naordinování správné léčby napadených stromů je nutné rozlišit, který patogen nemoc způsobil. Cílem diplomové práce byl vývoj diagnostických metod nejčastějších patogenů *Prunus armeniaca*.

Cíl diplomové práce byl splněn u patogenů *Candidatus Phytoplasma prunorum* a *Monilinia laxa*, kdy byla bez výhrad prokázána jasná přítomnost ve vzorcích. Metoda detekce *Cytospora cincta* byla s určitými připomínkami vyhodnocena rovněž jako úspěšná. Zároveň se ukazuje, že patogen *C. cincta* pravděpodobně zodpovídá za většinu škod na stromech a má potenciál ovlivňovat přítomnost ostatních patogenů.

Výskyt *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* sekvenace potvrdily, ovšem pouze v přítomnosti a nadbytku protektivního organismu rostlin *Pseudomonas fluorescens*. Z tohoto pohledu je požadavek specifity detekce nesplněný.

Patogeny *Verticillium dahliae* a *Eutypa lata* nebyly ve vzorcích detekované sekvenací. Bez pozitivní kontroly v podobě čistých kultur patogenů lze jen prohlásit, že se *V. dahliae* a *E. lata* ve stromech nevyskytují nebo je četnost výskytu velmi nízká.

8. Summary

Pathogens infecting apricots are relatively large and phylogenetically diverse, but they cause diseases with similar symptoms. For choosing a good treatment for infected trees is necessary to distinguish which pathogen cause the disease. The goal of the Thesis was to develop a diagnostic method for the most common pathogens of *Prunus armeniaca*.

The goal of the Thesis was fulfilled for pathogens *Candidatus phytoplasma prunorum* and *Monilinia laxa*, where we demonstrated a presence of pathogens without problems. *Cytospora cincta* detection method was evaluated with some comments as successful as well. It also shows, that the pathogen *C. cincta* is probably responsible for a majority of damage to tested trees and has the potential to affect the presence of an others pathogens.

An occurrence of *Pseudomonas syringae*, pv. *syringae* was confirmed by sequencing, but only with the presence and abundance of the protective plant organism *Pseudomonas fluorescens*. From this point of view, the specificity requirement of detection failed.

Pathogens *Verticillium dahliae* and *Eutypa lata* were not detected in the sequenced samples. Without the positive control in the form of pure cultures of pathogens we can only say, that *V. dahliae* and *E. lata* are not present in the tested trees or they are present in a low manifold.

9. Seznam zkratek

ACLR	Chlorotická svinutka listů meruněk
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Páry bazí
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty
ddNTPs	Dideoxynukleotidtrifosfáty
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ESFY	Evropská žloutenka peckovin
ETS	Vnější přepisovaný mezerník
FP	Přímý primer
ITS	Vnitřní přepisovaný meterník
IGS	Mezigenový mezerník
K.2	Klon testovaného stromu
M.72A	Klon testovaného stromu
M.44	Klon testovaného stromu
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDA	Bramborový dextrósový agar
RAPD analýza	Analýza polymorfie délky restrikčních fragmentů
RP	Reverzní primer
TBE pufr	Tris/Borate/EDTA pufr
<i>Taq</i> polymeráza	DNA polymeráza z organismu <i>Thermus aquaticus</i>
Ta	Annealingová teplota
Tm	Teplota tání
VP.126	Klon testovaného stromu

10. Seznam použité literatury

Adams, G., Hammar, S. & Proffer, T. Vegetative compatibility in leucostoma persoonii. *Phytopathology*. **1990**, Vol. 80, Number. 3, s. 287 - 291.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **(1990)** J. Mol. Biol. 215:403-410

Apricot. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 12th March 2005, last modified on 19th January **2011** [cit. 2011-01-23]. Dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Apricot>>.

Arumuganathan, K.; Earle, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*. **1991**, Volume 9, Number 3, s. 208-218.

Biggs, A.; Grove, G. Leucostoma canker of stone fruits. *The Plant Health Instructor* [online]. **2005**, [cit. 2011-01-31]. Dostupný z WWW: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/LeucostomaCanker.aspx>>

Biolib [online]. **2002** [cit. 2011-01-25]. Taxontree. Dostupné z WWW: <<http://www.biolib.cz/cz/taxontree/id14772/>>.

Carginale, V.; Giovanna, M.; Capasso, C.; Ionata, E.; La Cara, F.; Pastore, M.; Bertaccini, A. & Capasso, A. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of Prunus armeniaca by messenger RNA differential display. *Gene*. 12th May **2004**, 332, s. 29-34 .

DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Chemistry Guide. Foster city, USA: Applied Biosystems, **2009**. 296 s.

DT [online]. c**2011** [cit. 2011-02-13]. OligoAnalyzer 3.1. Dostupné z WWW: <<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>>.

Endert-Kirkpatrick, E.; Ritchie, D. F. Involvement of pH in the competition between *Cytospora cincta* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Ecology and Epidemiology*. **1987**, 78, s. 619-624.

EPPO Gallery [online]. Říjen **2008** [cit. 2011-01-26]. Monilinia fructicola (MONIFC). Dostupné z WWW: <[http://photos.eppo.org/index.php/album/277-monilinia-fructicola-monifc->](http://photos.eppo.org/index.php/album/277-monilinia-fructicola-monifc-).

Faostat [online]. **2008** [cit. 2011-01-25]. Countries by commodity. Dostupné z WWW: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.

Fradin, F.; Thomma, B. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*. March **2006**, Issue 2, s. 71-86.

Grimplet, J.; Romieu, Ch.; Audergon, J.-M.; Marty, I.; Albagnac, G.; Lambert, P.; Bouchet, J.-P. & Terrier, N. Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armeniaca*) ripening among 13 006 expressed sequence tags. *Physiologia Plantarum*. **2005**, 125, s. 281-292.

Hagen, L.; Khadari, B.; Lambert, P. & Audergon J.-M. Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *TAG Theoretical and Applied Genetics* . 7 June **2002**, 105, s. 298-305.

HortAnswers [online]. c**2011** [cit. 2011-02-01]. *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. Dostupné z WWW: <<http://urbanext.illinois.edu/hortanswers/detailproblem.cfm?PathogenID=26>>.

Juroch, J. EAGRI [online]. Prosinec **2006** [cit. 2011-01-26]. Moniliniová spála. Dostupné z WWW: <http://eagri.cz/public/web/file/58571/Moniliniova_spala.pdf>.

Kim, J. H; Mahoney., N.; Chan, K. L. ; Molyneux, R. J. & Cambell B. C. Secondary Metabolites of the Grapevine Pathogen *Eutypa lata* Inhibit Mitochondrial Respiration, Based on a Model Bioassay Using the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Microbiology*. **2004**, Number 4, s. 282-287.

Maki, L. R.; Galyan, E. L.; Chang-Chien, M.-M. & Caldwell, D. R. Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology*. September **1974**, No. 3, s. 456-459.

Côte, M.-J.; Tardif, M.-C. & Meldrum, A. J. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on Inoculated and Naturally Infected Fruit Using Multiplex PCR. *Plant disease*. November **2004**, 88, s. 1219 - 1225.

Munkvold, G. P. Eutypa Dieback of Grapevine and Apricot. *Plant Health Progress* [online]. 19th February **2001**, [cit. 2011-02-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/dieback/>>.

Museum of Learning [online]. c**2011** [cit. 2011-02-09]. Internal Transcribed Spacer. Dostupné z WWW: <http://www.museumstuff.com/learn/topics/Internal_transcribed_spacer>.

Navrátil, M.; Fialová, R. *Fytoplazmy - Významné patogeny rostlin*. Praha: Česká fytopatologická společnost, **2008**. 156 s.

NCBI [online].[cit. 2011-02-13]. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

Nečas, T.; Krška, B.; Ondráček, I. *Multimediální učební skriptum ovocnictví* [online]. **2004** [cit. 2011-01-25]. Meruňka. Dostupné z WWW: <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/ovoc_1/data/merunka.pdf>.

Nečas, T.; Krška, B. *Choroby* [online]. **2006** [cit. 2011-01-27]. *Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin*. Dostupné z WWW:

<http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/>.

Premier Biosoft International [online]. c1994-**2011** [cit. 2011-02-13]. PCR Primer Design Guidelines. Dostupné z WWW:

<http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html>.

Primer3 [online]. [cit. 2011-02-13]. Dostupné z WWW: <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>>.

Royal Horticultural Society [online]. c**2010** [cit. 2011-01-30]. Bacterial canker. Dostupné z WWW: <<http://apps.rhs.org.uk/advicesearch/profile.aspx?pid=86>>.

Shalini; Srivastava. Screening for Antifungal Activity of *Pseudomonas Fluorescens* Against phytopathogenic fungi. *The Internet Journal of Microbiology*. **2008**, Volume 5, Number 2.

Snyder, Ch. L.; Jones, A. L. Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Canadian Journal of Plant Pathology* . **1991**, 21, s. 70-77.

Sorokina, I.A.; Terekhina, N.V. *Agroatlas* [online]. c2003-**2009** [cit. 2011-01-25]. *Prunus armeniaca* L. – Common apricot. Dostupné z WWW:

<http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Prunus_armeniaca_K/>.

Summit Landscape [online]. **1998** [cit. 2011-02-01]. Verticillium wilt (*Verticillium dahliae*). Dostupné z WWW:

<<http://www.summitlandscapeinc.com/TREEpubs/Summit%20Verticillium%20Wilt.pdf>>.

Sze, D.; Pogliano, K. *MicrobeWiki* [online]. **2010** [cit. 2011-01-30]. *Pseudomonas syringae*. Dostupné z WWW:

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_syringae>.

Thompson J. D.; Higgins D. G.; Gibson T. J. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).

Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*. Praha: Victoria publishing, 1995. 1325 s.

VSUO [online]. c2005-2011 [cit. 2011-01-26]. Moniliová hniloba peckovin. Dostupné z WWW: <<http://www.vsu.cz/index.php?page=7304>>.

Yang He, S.; Huang, H.-Ch. & Collmer, A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*. 2 July 1993, Issue 7, s. 1255-1266 .