národní
úložiště
šedé
literatury

Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, Prunus domestica L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. Prunus

Polák, Jaroslav; Kumar, Jiban; Krška, Boris; Komínek, Petr; Jarošová, Jana
2014

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-386514

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 20.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. *Prunus.*

Jaroslav Polák, Jiban Kumar, Boris Krška, Petr Komínek, Jana Jarošová

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha-Ruzyně

2014

Autoři: Doc.Ing. Jaroslav Polák, DrSc., Ing. Jiban Kumar, PhD., Prof. Ing. Boris Krška, PhD., Ing. Petr Komínek, PhD., Ing. Jana Jarošová

Název: Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. *Prunus.*

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha-Ruzyně, Drnovská 507, 161 06 Praha 6

Vyšlo v roce: 2014

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: polak@vurv.cz

Odborný oponent: Ing. Petr Svoboda, CSc, Chmelařský institut s.r.o., Kadaňská 2525, 438 46 Žatec.

Oponent ze státní správy: Ing. Michal Hnízdil, odbor rostlinných komodit, Ministerstvo zemědělství

Autoři fotografií: Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc., titulní strana, obr. 1 – 6.
M. Ducháčová, obr.7.
Ing. Jana Jarošová, obr. 8, 9.
Ing. Petr Komínek, PhD., obr. 10, 11

Fotografie na úvodní straně: Polní výsadba geneticky modifikované švestky *Prunus domestica* L., klon C5 (cv. ´Honey Sweet´) v roce 2010.

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky a je výstupem řešení projektu NAZV QI 101A123.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha-Ruzyně, 2014

ISBN: 978-80-7427-158-8

.

I) Cíl metodiky

Úvod do problematiky.

Výzkum GM švestky *Prunus domestica* L., klon C5, uvolněné v USA v roce 2011 k neomezenému pěstování vč. konzumace plodů jako odrůda ‚HoneySweet', započal ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v roce 2001. Na jaře roku 2003 byla ve VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně založena polní pokusná výsadba této GM/Biotech švestky a každoročně probíhalo její hodnocení. Mezinárodní organizace pro komercionalizaci GM plodin – International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) doporučuje používat pro geneticky modifikované plodiny (GM) spíše název biotechnologické plodiny (Biotech), protože u neinformované veřejnosti navozuje první název obavy, které jsou ovšem zcela neopodstatněné. ISAA vydává každoročně několika set stránkovou odbornou publikaci „Global status of commercialized Biotech/GM crops", v jejímž názvu jsou obě zkratky jako synonyma. Obdobným způsobem postupujeme v této certifikované metodice a používáme střídavě obě synonyma. V roce 2009 byla vydána první certifikovaná metodika zahrnující hodnocení příznaků na listech stromů Biotech švestky během šesti let, do roku 2008 a diagnostické postupy stanovení zkoumaných virů pomocí ELISA, ISEM a RT-PCR. V uvedeném období stromy ještě nekvetly a neměly plody. Tato první metodika obsahuje i postup zjišťování rizika rekombinací mezi PPV-Rec a homologním transkriptem ve švestce ´HoneySweet´, tehdy ještě klon C5. Předkládaná „Komplexní metodika…" prezentuje metodické postupy a výsledky za uvedené období a další léta hodnocení 2009-2014. Zcela nové jsou kapitoly hodnocení kvality plodů švestky ´HoneySweet´ (Prof. B. Krška ve spolupráci s Doc. J. Polákem) i hodnocení příznaků PPV na plodech (J. Polák) a hodnocení možného přenosu transgenu do rostlin rodu *Prunus* (Ing. P. Komínek, PhD.).

Karantenní virus šarky švestky, *Plum pox virus* (PPV) je v ČR nejškodlivějším virem ovocných dřevin, který v 60. a 70. létech 20. století devastoval výsadby švestek a koncem století vážně poškodil i sady meruněk a broskvoní. Tuto situaci charakterizuje i skutečnost, že likérky produkující slivovici ještě začátkem 21. století dovážely 95% suroviny, švestek, převážně z Rumunska. Intenzivní výzkum problematiky PPV je realizován od 70. let především ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v.v.i., Praha-Ruzyně. Byla vyhodnocena rezistence desítek odrůd peckovin k PPV a zjištěny odrůdy se zvýšenou rezistencí meruněk, slivoní a broskvoní k PPV. Byla prokázána imunita odrůdy meruňky Harlayne k řadě izolátů a kmenů PPV a ve spolupráci se šlechtiteli meruněk a broskvoní ze Zahradnické fakulty Lednice, Mendelu Brno otestovány desítky kříženců na rezistenci k PPV. Z některých kříženců vznikly nové odrůdy s vysokou rezistencí k PPV, např. odrůda meruňky ´Betinka´. Byla ověřována dědičnost *Plum pox virus* markery rezistence.

Dosud však neexistují kvalitní odrůdy švestky, rezistentní k šarce, které by mohly nahradit vysoce kvalitní, ale k PPV silně náchylnou odrůdu ´Domácí švestka´. Klasické šlechtění na

rezistenci je časové náročné, může trvat desítky let, a nemusí být úspěšné, neboť rezistence je založena multigenně, a také se dosud nikomu nepodařilo získat rezistentní odrůdu švestky s kvalitou švestek náchylných k PPV, jako jsou ´Domácí švestka´ (ČR), ´Požegača´ (Jugoslávie), ´Bystrická´ (Rumunsko), ´Hauszwetske´ (Německo). V posledních dvaceti letech se v zahraničí rozšiřuje využívání transgenní (GM) rezistence. Princip genetické modifikace rostlin je obdobou imunizace zvířat a lidí proti infekčním chorobám. Podobně jako dítě po aplikaci vakcíny získá odolnost proti viru neštovic, rostlina po vložení části virového proteinu do genomu získá odolnost proti rostlinnému viru, v daném případě *Plum pox viru*. Jedná se o novou, velmi prospěšnou technologii, která je bohužel, dnes již jen v Evropě většinou společnosti z neznalosti, nebo z politických nebo aktivistických důvodů ignorována. V ostatních světadílech, ve vyspělých i rozvojových státech je na obrovském vzestupu. v současnosti se GM odrůdy rostlin pěstují na 180 milionech ha zemědělské půdy, včetně ovocných druhů a zeleniny, z toho je ca 45% pěstováno v průmyslově vyspělých státech a ca 55% v rozvojových státech. V USA se tyto odrůdy pěstují na více než 70 milionech ha. V zaostalé Evropě je to méně než 140tis. ha (0,08%), a to pouze GM kukuřice, převážně ve Španělsku, v ČR je to ca 2,5tis. ha. Získání, ověřování a pěstování odrůd rostlin s transgenní rezistencí eliminuje škody způsobované hospodářsky významnými patogeny a zejména nízkou kvalitu produkce nemocných a k chorobám a škůdcům náchylných rostlin. Ověřování rezistence švestky *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky a dalším dvěma virům způsobujícím pseudošarku je prvním polním pokusem s geneticky modifikovanou vytrvalou ovocnou kulturou v České republice. Výzkum GM švestky *Prunus domestica* L., klon C5, v roce 2011 uvolněný v USA k neomezenému pěstování vč. konzumace plodů jako odrůda ´HoneySweet´ započal ve VÚRV v.v.i. Praha - Ruzyně v roce 2001. Na jaře roku 2003 byla založena polní výsadba pokusu ověřování rezistence GM švestky, klon C5 k PPV a dalším hospodářsky významným virům. První metodika hodnocení rezistence GM švestky byla vypracována na základě osmiletých výsledků hodnocení. Vzhledem k tomu, že pokusný sad musel být založen, s ohledem na zákonné podmínky ve větrné poloze ruzyňského letiště, nevhodné pro pěstování ovocných kultur, a v zimním období 2005 byl mladý sad poškozen okusem zvěří, došlo k opoždění fáze plodnosti, takže do první metodiky nemohlo být zařazeno hodnocení kvality plodů. Vedle toho Ministerstvo životního prostředí nařídilo v roce 2008 ověřovat možnost přenesení transgenu z rostlin GM do rostlin r. *Prunus* vyskytujících se v okolí pokusu. V roce 2009 byla vydána certifikovaná metodika „Metodika hodnocení rezistence transgenní švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky a ke směsným infekcím s dalšími viry“ hodnotící rezistenci polní výsadby stromů GM k PPV. Byl popsán metodický postup hodnocení příznaků na listech stromů GM inokulovaných PPV-Rec a kombinacemi s ACLSV a PDV, sérologického stanovení PPV, ACLSV a PDV pomocí ELISA, stanovení relativní koncentrace PPV v listech pomocí semikvantitativní DAS-ELISA (titr viru), elektronmikroskopického stanovení přítomnosti intaktních částic PPV v listech stromů Bitech švestky, molekulární stanovení PPV, ACLSV a PDV v listech stromů GM pomocí RT-PCR a hodnocení rizika rekombinací mezi PPV-Rec a homologním transgenním transkriptem v rostlinách Biotech. V roce 2010 bylo zahájeno řešení výzkumného projektu NAZV QI

101A123 „Komplexní výzkum rezistence transgenních rostlin *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, viru zakrslosti slivoně a viru chlorotické skvrnitosti jabloně, identifikace netransgenních zdrojů rezistence slivoně k PPV“ ve kterém pokračovalo hodnocení příznaků PPV na stromech GM švestky, klon C5 pod stálým a silným infekčním tlakem PPV a jeho kombinací s dalšími viry, virem zakrslosti slivoně, *Prune dwarf virus* (PDV) a virem chlorotické skvrnitosti jabloně, *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), stanovení virů pomocí ELISA, ISEM a RT-PCR. Od roku 2010, kdy stromy začaly plodit, bylo hodnocení koncentrováno na hodnocení kvality plodů a porovnání s kvalitou plodů odrůd švestky ´Stanley´ a ´Jojo´ a dle požadavku Ministerstva životního prostředí i na ověřování možnosti přenesení transgenu z rostlin GM do rostlin r. *Prunus* rostoucích v okolí pokusu. Na základě získaných výsledků tohoto výzkumu byla vypracována předkládaná certifikovaná „Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. *Prunus*“.

Podmínky a založení polní výsadby pro ověřování rezistence GM/Biotech švestky ´HoneySweet´ k virům.

Zkoušení a pěstování transgenních rostlin a odrůd je v České republice od roku 2001 upraveno zákonem č.133/00 Sb. "O nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty". V souladu s tímto zákonem bylo ve VÚRV Praha-Ruzyně v roce 2001 započato s dlouholetým komplexním výzkumem rezistence a ověřováním vhodnosti pěstování transgenní švestky domácí s genem kapsidu viru šarky švestky v podmínkách trvalého vysokého tlaku inokula včetně směsných infekcí s dalšími hospodářsky významnými viry. Dr. Scorza dodal z USA koncem roku 2001 rouby transgenní švestky. V roce 2001 byly vysazeny viruprosté podnože St. Julien, na které byla zjara 2002, v technickém izolátu naroubována transgenní švestka domácí, klon C5. Jednoletí šlechtěnci transgenní švestky domácí byli v srpnu 2002 inokulováni virem šarky švestky, kmen PPV-Rec, a kombinacemi PPV-Rec s virem zakrslosti slivoně (PDV) a virem chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV) očkováním, použitím oček z roubů peckovin infikovaných uvedenými viry. Na jaře roku 2003 byla založena polní výsadba pokusu ověřování rezistence geneticky modifikované švestky, klon C5 k virům. Polní pokus byl založen v souladu s povolením a rozhodnutím Ministerstva životního prostředí. VÚRV v.v.i. má k provozování pokusné polní výsadby povolení MŽP 68730/ENV/06 a další rozhodnutí 41538/ENV/09 o rozšíření pokusu. Povolení výsadby bylo prodlouženo dalším rozhodnutím MŽP 96892/ENV/12 do konce roku 2017.

Vlastní cíl pokusu a předkládané metodiky.

Cílem řešení a předkládané metodiky byl komplexní výzkum rezistence a vhodnosti pěstování transgenní švestky *Prunus domestica* L., klon C5 s genem kapsidu viru šarky švestky (PPV) v podmínkách vysokého tlaku inokula viru šarky švestky, kmen PPV-Rec a směsného inokula, kdy pro směsné infekce byly vybrány dva nejškodlivější z dalších virů infikujících švestku, virus

zakrslosti slivoně (PDV) a virus chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV), které způsobují příznaky pseudošarky. Podobný výzkum, kdy vedle PPV byly zkoumány i směsné infekce se dvěma dalšími hospodářsky významnými viry, PDV a ACLSV, nebyl dosud nikde prováděn. Předkládaná metodika obsahuje metodický postup založení pokusu, pěstování rostlin v pokusném sadu a vyhodnocení rezistence Bitech švestky k infekci PPV a kombinacím s dalšími dvěma viry, ACLSV a PDV. Předkládaná metodika bude sloužit k dalšímu hodnocení, k rozhodovacím řízením na MZe, MŽP a ÚKZÚZ a k dalším pokusům s geneticky modifikovanými vytrvalými zemědělskými kulturami. Bude využita i v souvislosti se skutečností, že Mezinárodním výzkumným týmem pro švestku ´HoneySweet´ bylo na jeho jednání ve VÚRV v.v.i. Praha v roce 2011 rozhodnuto, že VÚRV v.v.i. podá EFSA a Evropské unii žádost o uvolnění švestky ´HoneySweet´ k pěstování a konzumaci plodů. S přítomnými zástupci MZe bylo dohodnuto, že žádost bude podána prostřednictvím MZe. Mezinárodní koordinací přípravy návrhu byl týmem pro tuto švestku pověřen Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc.

II) Vlastní popis metodiky

Příprava transgenních rostlin švestky – očkování na viruprostou podnož

K přípravě geneticky modifikovaných rostlin švestky domácí, *Prunus domestica L.*, klon C5, dále jen GM/Biotech, s rezistencí k viru šarky švestky použijeme rouby a očka geneticky modifikovaných rostlin GM švestek a naroubujeme, nebo naočkujeme je na viruprosté podnože s dobrou afinitou. V našem pokusu jsme použili podnož St. Julien. Pro jednu pokusnou kombinaci připravíme ca deset, nejméně však pět rostlin, přičemž jako kontrola slouží stejný počet zdravých, neinfikovaných rostlin. Roubování stromů provádíme zjara, očkování v srpnu, v technické izolaci. V našem pokusu jsme použili 11 rostlin pro každou z pěti kombinací, klonem C5 bylo naroubováno 55 podnoží St. Julien. Pokus byl v roce 2011 rozšířen o 5 rostlin očkovaných pouze PDV a 5 rostlin očkovaných pouze ACLSV.

Inokulace transgenních rostlin švestky očky z roubů infikovaných PPV-Rec, ACLSV, PDV.

Jednoleté šlechtěnce geneticky modifikované GM švestky pěstované v technickém izolátu inokulujeme v srpnu očkováním jednotlivými viry, resp. očky pocházejícími ze stromů infikovaných v našem případě rekombinantním kmenem viru šarky švestky (PPV-Rec), virem zakrslosti slivoně, *Prune dwarf virus* (PDV), a virem chlorotické skvrnitosti jabloně, *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV). Zdroje infekce je nutno udržovat v technické izolaci tak, aby příslušný strom byl infikován pouze jedním virem, na rezistenci k němuž budeme příslušnou skupinu rostlin zkoušet. K očkování použijeme vyzrálá očka zelených roubů z rostlin (stromů) infikovaných příslušným virem. Na jeden zkoušený strom použijeme dvě infikovaná očka, abychom dosáhli pokud možno 100 % infikovaných stromů. V případě kombinovaných infekcí použijeme vždy dvě očka infikovaná jedním virem a kombinace očkujeme v předem stanoveném

pořadí od báze kmínku směrem k vrcholu rostliny tak, abychom věděli jakým virem bylo příslušné rostoucí očko infikováno.

V našem pokusu je sedm kombinací stromů klonu C5 infikovaných PPV-Rec, PDV, ACLSV, PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV + PDV, a zdravá neinfikovaná kontrola. Pokus byl rozšířen o dvě kombinace, stromy inokulované jednotlivými viry, PDV a ACLSV, na celkem sedm kombinací.

Založení polní výsadby a uspořádání pokusu

Na jaře dalšího roku zkontrolujeme uchycení a rašení oček infikovaných PPV-Rec, ACLSV a PDV a založíme polní výsadbu pokusných stromů (Obr. 1). Stromy infikované v technické izolaci vysadíme v prostorové izolaci, jednotlivé kombinace PPV-Rec, PPV-D, PPV-ACLSV, PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV + PDV a zdravé kontrolní stromy (Obr. 2) do řad v běžném sponu. Očka infikovaná jednotlivými viry necháme růst a rostoucí výhony, které jsou netransgenní částí stromů každoročně zkracujeme tak, aby nebránily růstu geneticky modifikované části stromů. Polní výsadbu umístíme v prostorové izolaci tak, aby byla do vzdálenosti 1000 m obklopena travním porostem, obilninami, případně ochranným pásem jiných druhů peckovin.

Ošetřování výsadby, řez stromů

Polní výsadbu rostlin švestky *P. domestica* L., klon C5 s transgenní rezistencí k viru šarky švestky udržujeme v optimálním stavu, chráněnou před chorobami a škůdci. Výsadbu rostlin Biotech, varianty infikované PPV-Rec, PDV, ACLSV, PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV + PDV, PDV, ACLSV, udržujeme průběžně po celou dobu trvání pokusu. Každoročně provádíme zimní a letní řez stromů, přihnojování minerálními hnojivy, okopávání a odplevelování kolem stromů, kultivaci mezi řadami stromů před zatravněním, sekání travního porostu mezi řadami stromů po zatravnění pokusu, doplňkovou zálivku v obdobích sucha, ochranu proti okusu zvěří a proti hraboši polnímu, postřiky proti mšicím a dalším savým a žravým škůdcům, v době květu dvakrát postřik proti pilatce švestkové – na začátku a ke konci kvetení, třikrát postřik proti monilii sp., na začátku kvetení, ke konci kvetení a po odkvětu. V době trvalejších dešťů je nutno postřik proti monilii opakovat po každém ukončení deště, nejdéle do 24 hodin. V červenci je nutno provést postřik proti monilióze plodů, které dozrávají během měsíce srpna. Pokud není v sadu přítomna další odrůda jako opylovač této švestky, je třeba provést ruční opylování květů, neboť Biotech švestka je cizosprašná. Pro opylení použijeme směs pylů dvou nebo třech různých odrůd švestky.

Hodnocení příznaků na listech a plodech stromů transgenní švestky inokulované PPV-Rec, PDV, ACLSV a kombinacemi s ACLSV a PDV.

Příznaky na listech stromů Biotech švestky cv. ´HoneySweet´ hodnotíme v průběhu vegetační sezóny. Infikované i kontrolní strom hodnotíme během vegetačního období od května do září minimálně třikrát (květen/červen, červenec, konec srpna) tak, abychom zjistili začínající příznaky a jejich vývoj, změny intenzity příznaků, případně jejich vymizení koncem vegetačního období. Při hodnocení příznaků, které jsou zpravidla v podobě mírných ojedinělých difuzních skvrn na starších listech (Obr. 3) a listech v blízkostí infikovaných roubů netransgenních částí stromů, a mohou se vyskytnout jen na několika málo listech, je třeba se soustředit na tyto partie stromů. Na mladších a vrcholových listech jsme příznaky PPV nikdy nezjistili. Intenzitu příznaků PPV na listech GM švestky porovnáváme s intenzitou příznaků na netransgenních výhonech infikovaných jednotlivými viry.

Příznaky na listech stromů transgenní švestky inokulovaných kombinacemi virů byly hodnoceny dvanáct vegetačních sezón 2003-2014. Na listech GM švestky jsme nikdy nepozorovali žádné příznaky virů ACLSV a PDV. Rovněž listy netransgenních výhonů vyrůstajících z oček infikovaných ACLSV, nebo PDV byly bez jakýchkoli příznaků těchto virů. Přítomnost ACLSV i PDV však byla v listech těchto výhonů pomocí ELISA prokázána. Naopak ve druhém vegetačním období se na listech těchto výhonů objevily silné příznaky PPV, virus se do těchto výhonů přes transgenní část stromu systémově rozšířil. Příznaky PPV a jejich intenzita na listech všech zkoušených kombinací, tj. PPV-Rec, PPV-Rec + ACLSV, PPV Rec + PDV i PPV-Rec + ACLSV + PDV byly stejné. Projev a intenzita příznaků PPV nebyly přítomností dalších virů ovlivněny.

Druhý rok po inokulaci PPV-Rec se objevily mírné příznaky šarky na bazálních listech stromů Biotech švestky cv. ´HoneySweet´. Od třetího (2006) do osmého roku po inokulaci tyto mírné příznaky dále slábly (Obr. 4), nebo nebyly zjištěny vůbec a v osmém roce byly jen na několika listech malého počtu stromů jednotlivých kombinací. Klesala i relativní koncentrace PPV. Přítomnost viru byla potvrzena DAS-ELISA, ISEM a RT-PCR. Na listech výhonů vyrůstajících z netransgenních infikovaných oček použitých jako inokulum přetrvávají silné příznaky šarky (Obr. 5, 6) a je v nich přítomna vysoká koncentrace viru. V listech některých stromů, jejichž počet v letech 2007 – 2010 každoročně přibýval, nebyly zjištěny žádné příznaky PPV. V tom ohledu nebyly překvapivě žádné rozdíly mezi variantami PPV-Rec, PPC-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV a PPV-Rec + PDV + ACLSV. Další dva viry nemají žádný vliv na příznaky infekce PPV, PDV ani ACLSV, nezpůsobují na listech stromů žádné příznaky, i když přítomnost ACLSV byla v listech prokázána pomocí ELISA i RT-PCR. Naproti tomu přítomnost PDV nebyla pomocí ELISA zjištěna a výsledky RT-PCR byly nejisté. V letech 2011-2013 již nebyly na listech žádného stromu zjištěny jakékoli příznaky PPV, i výsledky ELISA stanovení PPV byly negativní. V některých stromech, resp. listech pokusných stromů pod silným a permanentním infekčním tlakem ještě byla zjištěna nízká koncentrace PPV pomocí velmi citlivé molekulární

metody RT-PCR. V roce 2013 byly přes provedené dva postřiky proti moniliovému vadnutí všechny stromy švestky devastujícím způsobem silně postiženy moniliovou infekcí v době květu a trvalých dešťů, řada větví odumřela a poškozené části musely být zkráceny řezem. Vyvinulo se a dozrálo jen několik málo plodů, na některých stromech nebyly plody vůbec. V tom směru nebyly žádné rozdíly mezi kontrolními, neinfikovanými stromy a stromy inokulovanými PPV-Rec, PDV, ACLSV, a kombinacemi těchto virů. V roce 2014 se, velmi pravděpodobně v důsledku tohoto silného poškození a oslabení stromů moniliovou infekcí v roce 2013, znovu na některých stromech objevily na několika bazálních listech slabé příznaky viru šarky švestky (v rozsahu let 2009-2010) a přítomnost viru v těchto listech byla prokázána pomocí ELISA a RT-PCR.

Příznaky na plodech infikovaných stromů hodnotíme minimálně třikrát, v polovině června, července a v době dozrávání plodů v srpnu. Stromy Biotech švestky cv. ´HoneySweet´ začaly plodit v nepříznivé návětrné poloze ruzyňského letiště až v roce 2010. V tomto roce byly na ca 10% plodů jednotlivých kombinací permanentního infekčního tlaku zjištěny v červenci, kdy byly plody zelené, velmi mírné skvrny, příznaky PPV. Přítomnost nízké koncentrace PPV ve slupce i dužnině plodů byla prokázána pomocí ELISA i RT-PCR. Ve slupce plodů s mírnými příznaky byla koncentrace viru vyšší, než v dužnině plodů. V plodech bez příznaků nebyla přítomnost PPV pomocí ELISA prokázána, podobně, jako v listech. V době dozrávání plodů a tmavě modrém vybarvení tyto mírné příznaky zmizely a výsledky ELISA ve zralých plodech byly negativní. V dalších letech již na plodech švestky cv. ´HoneySweet´ žádné příznaky zjištěny nebyly a výsledky objektivních testů byly negativní. V roce 2014, po silném poškození stromů moniliovou infekcí, a přesto, že se na několika listech některých stromů pod permanentním infekčním tlakem objevily znovu mírné příznaky PPV, na plodech se žádné příznaky neobjevily. V některých plodech však přítomnost PPV byla prokázána, jak pomocí ELISA, tak molekulárním testem RT-PCR.

Hodnocení kvality plodů stromů GM/Biotech švestky

Plody byly v souladu s rozhodnutím MŽP sklízeny před plnou zralostí. Plody byly sklízeny z pokusné výsadby VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně po jednotlivých stromech a kombinacích. Plody z každého stromu byly spočítány a zváženy. Z každého vzorku kombinace smíchaných plodů byly odebrány plody na provedení testů ELISA a RT-PCR. Po třiceti plodech bylo odebráno a předáno na Zahradnickou fakultu Lednice, MENDELU v Brně k provedení hodnocení kvality plodů, a porovnání kvality s kvalitou plodů z kontrolních, neinokulovaných stromů a kvalitou plodů standardních odrůd ´Stanley´ a, nebo ´Jojo´ (Obr.7).

Z pohledu kvality plodů byly hodnoceny vnější a vnitřní pomologické znaky, které byly převzaty z metodik UPOV Species Code: PRUNU_DOM, Adopted on 06/11/2003 a modifikované interní metodiky pro hodnocení meruněk ve staniční zkoušce (Vachůn,1991 a kol).

a) vnější znaky

Vyrovnanost plodů (1-9 b), atraktivnost – vzhled (1-9 b), hmotnost plodů (g), výška plodu (mm), šířka plodu (mm), tloušťka plodu (mm), tloušťka dužniny (mm), tvar plodu (1-7), barva plodu základní (1-9), barva plodu krycí (1-7), praskání plodů (1-9), pevnost dužniny (1-9).

b) vnitřní znaky

Barva dužniny (1-9), chuť dužniny (1-9), odlučitelnost (1-9), refraktometrická sušina (%), hmotnost pecky (g), podíl pecky k plodu (%), chuť jádra (H, SH, S).

Přibližně 1 den po sklizni byly vizuální, i chuťové znaky hodnoceny podle výše zmíněných metodik, údaje byly statisticky zpracovány (program STATISTICA9). U znaků hodnocených klasifikační devíti bodovou stupnicí znamená 9 nejvyšší možnou úroveň. U vyrovnanosti plodu značí 1 – zcela nevyrovnaný (tvarově i barevně), 9 – zcela vyrovnaný. U atraktivnosti plodu znamená 1 – neatraktivní, 9 – vysoce atraktivní. Pokud je tvar plodu hodnocený 1 – protáhlý, 4 – kulovitý, 9 – opak vejčitý. Základní barva slupky je hodnocena následovně: 1 – zelenavě bílá, 2 – žlutavě zelená, 3 – žlutá, 4 – oranžově žlutá, 5 – purpurově fialová, 6 – fialově modrá, 7 – tmavě modrá. Barva dužniny byla hodnocena následovně: 1-2 – bělavá, 3-4 – žlutavě zelená, 5-6 – žlutá, 7-8 – oranžová, 9 – červená. U pevnosti dužniny značí 1 – měkká, 9 – velmi pevná. Chuťová stránka plodu může být posouzena jako 1 – extrémně špatná, 3 – špatná, 5 – přijatelná, 7 – dobrá, 9 – vynikající.

c) Titrovatelné kyseliny ($g.kg^{-1}$)

Acidimetricky byl dále stanoven celkový obsah titrovatelných kyselin v odrůdách. Stanovení proběhlo na základě metodiky: Stanovení obsahu veškerých kyselin. Zjištěné údaje byly v závěru vztaženy na 1 kg dužniny plodů dle následujícího vzorce:

$$m_{KD} = \frac{m_{KV}}{m_{vz.}} \cdot 1000$$

m_D…….množství kyselin obsažených ve vzorku (g)

Sérologické hodnocení přítomnosti PPV, ACLSV a PDV pomocí DAS-ELISA.

Sérologické stanovení jednotlivých virů provádíme pomocí DAS-ELISA postupem podle Clark a Adams (1977) s použitím komerčních kitů pro detekci PPV, ACLSV a PDV, ke kterým je přiložen podrobný metodický postup provedení imunoenzymatického testu, proto ho neuvádíme. Stanovení virů PPV-Rec, ACLSV a PDV pomocí ELISA v listech provádíme v měsíci červnu, tedy jednou během vegetačního období. Stanovení PPV v plodech provádíme ve slupce a dužnině plodu v období před dozráváním plodů, koncem července, nebo začátkem srpna, podle vývoje vegetace v tom kterém roce. V případě nejasných výsledků, nebo po zmizení příznaků je třeba test opakovat. Pro sérologický test odebíráme listy a plody s příznaky PPV, v případě, že příznaky PPV nejsou přítomny a pro stanovení ACLSV a PDV odebíráme starší, spodní listy na výhonech a plody v nižších partiích stromů, blíže k infekčnímu roubu, zdroji permanentní PPV infekce. Pro každé stanovení odebíráme minimálně čtyři listy z různých částí koruny stromu.

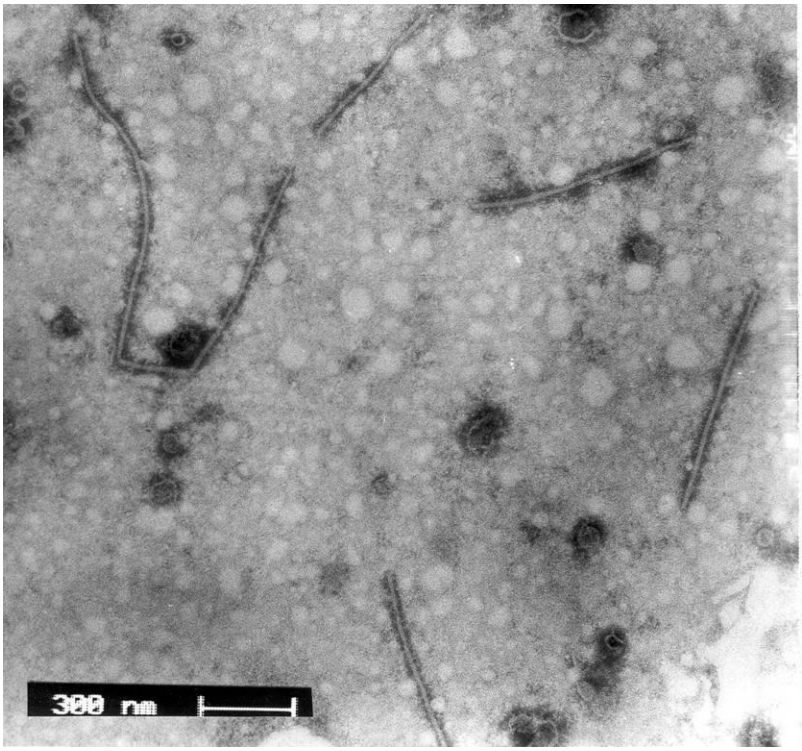
Příznaky na stromech transgenní švestky inokulovaných třemi kombinacemi virů byly hodnoceny po dvanáct vegetačních sezón 2003-2014, stejně tak jako stanovení virů PPV-Rec (rekvalif. PPV-M), ACLSV a PDV pomocí ELISA. Dosažené výsledky sérologického stanovení virů jsou prezentovány a diskutovány v části hodnocení příznaků na listech a v souvislosti s projevem příznaků PPV-Rec, ACLSV a PDV.

Elektronmikroskopické stanovení přítomnosti intaktních částic PPV v listech transgenní švestky.

Elektronmikroskopickým stanovením intaktních částic PPV ověřujeme přítomnost viru v listech geneticky modifikovaných rostlin klonu C5. Pro stanovení přítomnosti vláknitých částic PPV je nejvhodnější použít metodu imunosorbční elektronové mikroskopie (ISEM).

Elektronmikroskopické síťky potáhneme formwarovou membránou (4% roztok formwaru v chloroformu). Síťky pouhlíkujeme v pokovovacím přístroji za vysokého vakua. Potom síťky položíme pouhlíkovanou stranou na kapku antiséra proti PPV zředěného 1:2000, resp. na hodnotu titru použitého antiséra po dobu 150 minut. Síťky z kapky antiséra odebereme, přebytečné antisérum odsajeme, opláchneme několika kapkami 0.1 M Hepes pufru pH 7.0 a necháme zaschnout. Potom na síťku umístíme kapku homogenátu (0.5 g listů + 4.5 ml Hepes pufru) získaného z listů testovaného stromu s příznaky PPV, případně z listu bez příznaků, pokud se listy s příznaky PPV na testovaném stromu nevyskytují. Po 120 minutách kapku homogenátu odsajeme, opláchneme několika kapkami deionizované vody, povrch síťky necháme zaschnout a preparát kontrastujeme 4% roztokem fosfowolframové kyseliny pH 7.2 (vodný roztok) tak, že síťku položíme na 15 až 20 sek na kapku roztoku. Po zaschnutí síťky prohlížíme v elektronovém mikroskopu. Přítomnost vláknitých PPV částic je potvrzena dekorací protilátek. Negativně barvené (světlé) částice viru jsou po celé délce obaleny (dekorovány) tmavou vrstvou

specifických protilátek (Obr. 8). Tímto specifickým elektronmikroskopickým testem prokážeme, že se skutečně jedná o vláknité částice viru šarky švestky. Pokud by se jednalo o přítomnost jiného vláknitého viru (např. ACLSV), částice by zůstaly světlé a tenké (ca 13 nm), bez tmavé dekorace specifickými protilátkami.



Obr. 8. Dekorované částice PPV v listech Biotech švestky cv. ´HoneySweet´ infikované PPV-Rec.

Přítomnost kompletních vláknitých částic PPV jsme prokázali v letech hodnocení, kdy se vyskytly příznaky na listech, a pouze v listech s příznaky PPV. V listech bez příznaků viru nebyly intaktní částice PPV zjištěny. Částice byly stejné jako v listech netransgenních výhonů se silnými příznaky PPV. Částice PPV jsme v listech geneticky modifikovaného klonu GM švestky nacházeli jen ojediněle a díky tomu, že byly specifickými protilátkami z homogenátu adsorbovány.

Stanovení relativní koncentrace PPV v listech transgenní švestky pomocí semikvantitativní DAS-ELISA (stanovení titru viru)

Stanovením relativní koncentrace PPV zjišťujeme nízkou koncentraci viru v listech geneticky modifikovaných stromů ve srovnání s náchylnými, netransgenními částmi stromu, pokles koncentrace viru během vegetačního období, a v průběhu let trvání pokusu.

Relativní koncentraci PPV-Rec, nebo jiného kmenu PPV stanovíme pomocí semikvantitativní DAS-ELISA ve vzorcích připravených homogenizací listů Biotech švestky s příznaky viru. Vzorek čtyř listů z různých větví stromu homogenizujeme v poměru 1 g listů a 9 ml fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem na pH 7.2 s přídavkem 0.05% Tween 20, 0.2% polyvinylpyrrolidonu a 0.2% vaječného albuminu. Další ředění vzorků 1:2, 1:4, 1:8, atd. provedeme týmž pufrem. Vedle komerční pozitivní kontroly použijeme vzorky listů z výhonů PPV infikovaných oček jako druhou pozitivní kontrolu. Relativní koncentraci PPV proteinu stanovíme jako nejvyšší zředění homogenizovaného vzorku s pozitivní reakcí v DAS-ELISA (Albrechtová et al., 1986).

Relativní koncentrace PPV v listech geneticky modifikované *P. domestica,* klon C5 byla ca padesátkrát nižší, než v listech z výhonů vyrostlých z PPV infikovaných oček (netransgenní část stromu). Relativní koncentrace PPV v listech klonu C5 klesla během let hodnocení (2006-2010) desetkrát až padesátkrát v souladu s postupnou redukcí příznaků. V letech 2011-2013 pak dosáhla nulové hodnoty. Koncem srpna již nebylo po třech letech možno PPV v listech více než poloviny geneticky modifikovaných stromů GM švestky prokázat.

Stanovení PPV-Rec, ACLSV a PDV v rostlinách GM švestky pomocí RT-PCR

Odběr vzorku

Správný odběr vzorku je důležitý pro úspěšnou detekci. Ideální čas k odběrům je pozdní jaro, kdy je obvykle koncentrace viru ve stromech vysoká. Odebíráme nejlépe symptomatické středně staré listy, pokud možno rovnoměrně ze čtyř míst po obvodu koruny a z jednoho místa středu koruny stromu. Odebereme 1-2 g vzorku pro homogenizaci. Listy dopravíme v chladu do laboratoře, kde je buď ihned zpracujeme, nebo uchováváme při -80°C. Je také možno odebírat kůru nebo okvětní plátky, přičemž platí stejná pravidla.

Izolace RNA

Dalším důležitým krokem pro úspěšnost reakce je izolace kvalitní RNA v dostačující kvantitě a kvalitě. Pletiva dřevitých rostlin, obzvláště venku rostoucích, obsahují vyšší množství fenolických složek a polysacharidů, které mají inhibující vlastnosti (Nassuth et al., 2000). Tyto látky tvoří chemické vazby s nukleovými kyselinami i proteiny při homogenizaci vzorku. Přítomnost inhibitorů poté ovlivňuje aktivitu reversní transkriptázy anebo polymerázy a tím i spolehlivost celé reakce. Výsledek může být tedy negativní, ačkoli je virus v pletivu přítomen (Nassuth et al., 2000). Pro naše účely se ukázala být jako velice efektivní izolační sada od firmy Sigma-Aldrich Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Kvalitu izolované RNA je vhodné zkontrolovat spektrofotometricky a na agarózovém gelu. Při spektrofotometrickém měření se

vzorek nejprve naředí destilovanou vodou, obvykle 1:9 (RNA:H_2O). Měří se při vlnových délkách 260, 230 a 280 nm. To umožní hodnocení čistoty vzorku, očekávané poměry 260/280 a 260/230 jsou 2.0 pro RNA. Poměr absorbcí 260/280 menší než 1.75 svědčí pro obsah kontaminujících bílkovin. Absorbce při 230 nm značí nečistoty, jako jsou karbohydráty, fenolické sloučeniny, aromatické složky. Při výpočtu koncentrace optická hustota 1 odpovídá přibližně 40 ng/µl pro RNA. Vypočtená koncentrace by se „měla“ pohybovat mezi 200 - 1000 ng/µl. Tyto hodnoty slouží pouze k orientačnímu odhadu čistoty a koncentrace RNA, hodnoty, které nám umožní utvrdit se v konečném výsledku RT-PCR (např. v případě izolace RNA o koncentraci 700 ng/µl, poměrům 260/280 a 260/230 rovným 2 a negativního výsledku RT-PCR, kdy byl pozitivní výsledek u pozitivní kontroly, máme jistotu, že v daném vzorku virus opravdu není).

Integritu izolované RNA je dále dobré zkontrolovat na denaturujícím agarózovém gelu. Většinu izolované RNA tvoří RNA rostlinná a opět z rostlinné RNA převládá ribozomální RNA. Ta se na gelu rozdělí na dva silné „bandy“ - 18s a 28s ribozomální RNA, přičemž intenzita bandu 28s by měla být u intaktní neporušené RNA přibližně dvojnásobná intenzitě bandu 18s. Pokud nesouhlasí poměr 2:1 nebo jsou na gelu viditelné jen „šmouhy“, celistvost RNA byla porušena.

Izolace RNA „kolonkovou metodou“ firmy Sigma Aldrich - Spectrum™ Plant Total RNA Kit

A) Homogenizace vzorku za použití tekutého dusíku

1. Pro izolaci RNA potřebujeme 0,1 g rostlinného pletiva. Výhodnější je ovšem homogenizovat více a z homogenátu 0,1 g navážit. Vzorky homogenizujeme v tekutém dusíku, u vzorků uchovávaných na -80°C dbáme na to, aby nedošlo k jejich rozmražení, ideálně odebíráme z mrazicího boxu po každém vzorku zvlášť. Vzorek pečlivě homogenizujeme v předmražené třecí misce.

2. 0,1 g homogenizovaného materiálu navažte do 2 ml plastové sterilní mikrozkumavky.

3. Přidejte 500 µl extrakčního pufru připraveného namícháním lyzačního pufru z komerční soupravy Spectrum™ Plant Total RNA Kit, k němuž byl přidán 2-merkaptoetanol (2-ME) v poměru 10 µl 2-ME na 1 ml lyzačního pufru.

4. Minimálně 30 sekund vortexujte.

5. Nechte inkubovat 5 minut při 56°C ve vodní lázni.

B) Homogenizace vzorku bez tekutého dusíku

Bez tekutého dusíku lze homogenizovat pouze listy čerstvé. Jeho druhou nevýhodou je, že je před homogenizací nutno odvážit 0,2 g, a tedy ztrácíme možnost homogenizovat větší množství materiálu a zvýšit tím pravděpodobnost výskytu viru právě v daném odebraném materiálu.

1. Připravte si extrakční pufr z komerční soupravy Spectrum™ Plant Total RNA Kit - k pufru přidejte 2-merkaptoetanol (2-ME) v poměru 10 µl 2-ME na 1 ml extrakčního pufru. Na jeden vzorek bude zapotřebí 2 ml takto připraveného extrakčního pufru.

2. 0,2 g rostlinného pletiva vložte do homogenizačního igelitového pytlíku (stejný jako pro přípravu vzorků na ELISA test).

3. Přidejte 2 ml extrakčního pufru s přídavkem 2-merkaptoetanolu

4. Pečlivě homogenizujte.

5. 500 µl homogenátu odeberte do 2 ml mikrozkumavky a nechte inkubovat při 56°C ve vodní lázni.

6 Centrifugujte 3 min při maximální rychlosti.

6. Supernatant (cca 450 µl) odeberte do filtrační kolonky (modrá) ve 2 ml mikrozkumavce. Dbejte na zachování neporušeného peletu.

7. Centrifugujte 1 min při maximální rychlosti.

8. Kolonku odstraňte, zachovejte supernatant v 2 ml mikrozkumavce.

9. Přidejte 500 µl zachycovacího pufru Binding Solution. Okamžitě promíchejte pipetou nejméně 5x nebo jemně vortexujte. Nestáčejte v centrifuze!!!

10. Napipetujte 700 µl směsi do zachycovací kolonky (červená) ve 2 ml mikrozkumavce.

11. Centrifugujte 1 min při maximální rychlosti.

12. Supernatant odstraňte.

13. Přidejte zbytek směsi.

14. Centrifugujte 1 min při maximální rychlosti.

15. Supernatant odstraňte.

16. Přidejte 500 µl promývacího pufru 1 (Wash Solution 1). Centrifugujte 1 min při maximální rychlosti.

17. Supernatant odstraňte.

18. Přidejte 500 µl promývacího pufru 2 (Wash Solution 2). Centrifugujte 30 s při maximální rychlosti.

19. Supernatant odstraňte.

20. Ještě jednou přidejte 500 µl promývacího pufru 2 (Wash Solution 2). Centrifugujte 30 s při maximální rychlosti.

21. Supernatant odstraňte.

22. Vložte kolonku do nové zachycovací 2 ml mikrozkumavky a na sucho centrifugujte po dobu 1 min při maximální rychlosti.

23. Kolonku přendejte do další 2 ml mikrozkumavky; přímo na membránu napipetujte 50 µl elučního roztoku (Elution Solution).

24. Zavřete a nechte 1 minutu stát.

25. Stočte 1 min při maximální rychlosti. Tím se uvolní RNA.

26. Kolonku odstraňte, RNA uchovávejte v -20°C nebo -80°C.

One-step-RT-PCR pro detekci PPV-Rec

Z hlediska rychlosti a spolehlivosti je vhodnější používat one-step-RT-PCR, neboť redukcí kroků je sníženo riziko chyby a kontaminace. Při použití kitu QIAGEN OneStep RT-PCR je protokol následující:

1) 5 µl 5x pufr (konečná koncentrace 2.5 mM $MgCl_2$), 1 µl dNTPs (konečná koncentrace 200 µM každý nukleotid), 1 µl Q roztoku, 0.6 µl primeru RecJR a 0.6 µl primeru RecJF (tab. 1) o koncentraci 10 µM, doplnit RNase a DNase prostou H_2O do 23 µl a přidat 2 µl RNA.

2) Podmínky reakce jsou:

I) 50°C po dobu 30 min (reverzní transkripce);

II) 95°C po dobu 10 min (aktivace HotStarTaq polymerázy);

III) 35 cyklů ve třech krocích: 94°C po 20 s (denaturace), 55°C po 30 s (dosedání) a 72°C po dobu 1 min (polymerizace);

IV) 72°C po dobu 10 min (konečné prodlužování) a

V) 10°C uchovávání.

One-step-RT-PCR pro detekci PDV

Z hlediska rychlosti a spolehlivosti je vhodnější používat one-step-RT-PCR, neboť redukcí kroků je sníženo riziko chyby a kontaminace. Při použití kitu QIAGEN OneStep RT-PCR je protokol následující:

1) 5 µl 5x pufr (konečná koncentrace 2.5 mM $MgCl_2$), 1 µl dNTPs (konečná koncentrace 200 µM každý nukleotid), 1 µl Q roztoku, 0.6 µl primeru PDVdpR a 0.6 µl primeru PDVdpuF (Tab.1) o koncentraci 10 µM, doplnit RNase a DNase prostou H_2O do 23 µl a přidat 2 µl RNA.

Tabulka 1. Seznam primerů

Primer	Sekvence 5'-3'	T_m	Target	By
RecJR	AGCTGGTTGAGTTGTTGCCAC	66°C	PPV-Rec	
RecJF	AATGATATTGATGATAGCCTTGAC	60°C	PPV-Rec	
PDVdpR	CCT TTA ATG AGT CCG T	56°C	PDV	
PDVdpuF	CCG AGT GGA TGC TTC ACG	58°C	PDV	
ACLantisense	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	59°C	ACLSV	
ACLsense	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	58°C	ACLSV	
PPrecR9736	GAGTGAAACACTCGCTACAT	59°C	PPV-Rec	
PPrecF9245	GGC ACA TTT CAG TAA CGT GGC	61°C	PPV-Rec	

2) Podmínky reakce jsou:

VI) 50°C po dobu 30 min (reverzní transkripce);

VII) 95°C po dobu 10 min (aktivace HotStarTaq polymerázy);

VIII) 35 cyklů ve třech krocích: 94°C po 20 s (denaturace), 56°C po 30 s (dosedání) a 72°C po dobu 1 min (polymerizace);

IX) 72°C po dobu 10 min (konečné prodlužování) a

X) 10°C uchovávání.

One-step-RT-PCR pro detekci ACLSV

Z hlediska rychlosti a spolehlivosti je vhodnější používat one-step-RT-PCR, neboť redukcí kroků je sníženo riziko chyby a kontaminace. Při použití kitu QIAGEN OneStep RT-PCR je protokol následující:

6. 5 µl 5x pufr (konečná koncentrace 2.5 mM $MgCl_2$), 1 µl dNTPs (konečná koncentrace 200 µM každý nukleotid), 1 µl Q roztok, 0.6 µl primeru PDVdpR a 0.6 µl primeru PDVdpuF (Tab. 1) o koncentraci 10 µM, doplnit RNase a DNase prostou H_2O do 23 µl a přidat 2 µl RNA.

7. Podmínky reakce jsou:

XI) 50°C po dobu 30 min (reverzní transkripce);

XII) 95°C po dobu 10 min (aktivace HotStarTaq polymerázy);

XIII) 35 cyklů ve třech krocích: 94°C po 20 s (denaturace), 56°C po 30 s (dosedání)

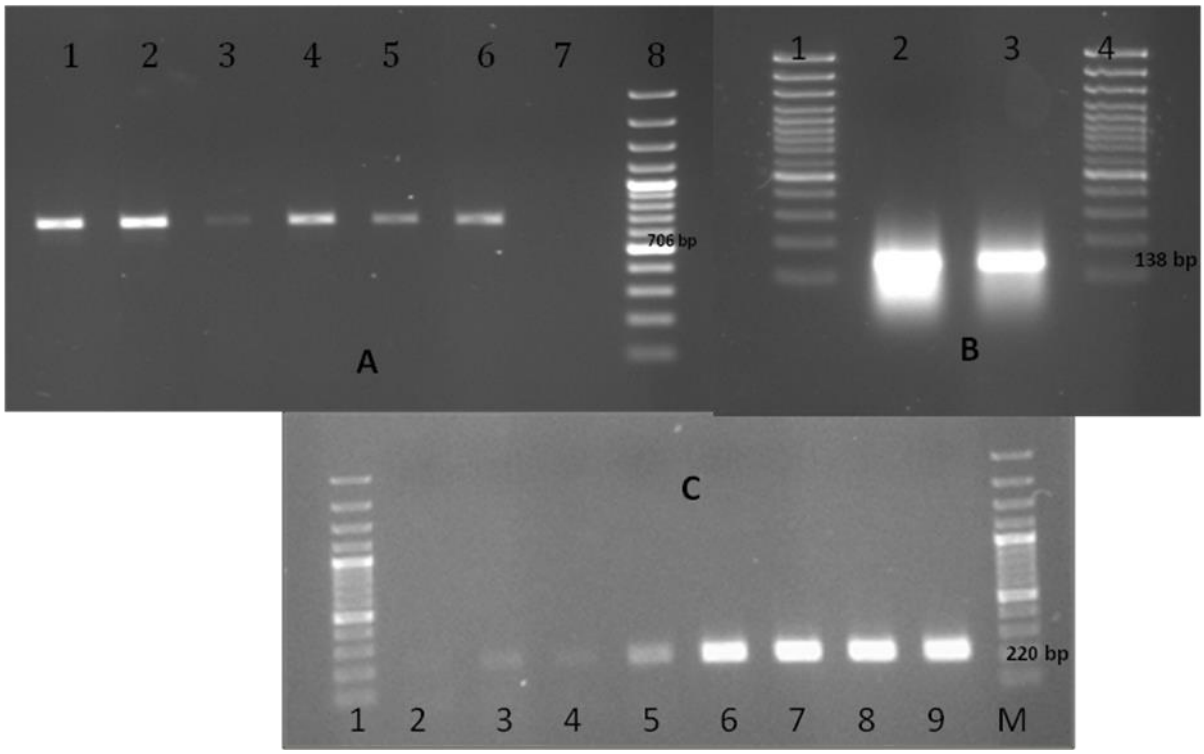
XIV) a 72°C po dobu 1 min (polymerizace);

XV) 72°C po dobu 10 min (konečné prodlužování) a

XVI) 10°C uchovávání

Vizualizace PCR produktů

Vizualizace PCR produktů probíhá za pomoci elektroforetického rozdělení fragmentů v agarózovém gelu (je doporučeno použití 1,5 - 2,5 % gelu pro lepší oddělení jednotlivých produktů) s předchozím označením DNA za použitím etidium bromidu, Syber Green, nebo podobného barviva. 5 µl produktu obarveného barvivem je nanášeno na gel a podstoupeno 3-9 V/cm po dobu 60 - 90 min dle velikosti gelu. Produkt primerů RecJR a RecJF je dlouhý 138 bp; PDVdpR a PDVdpuF 220 bp a ACLantisense a ACLsense tvoří 706 bp dlouhý produkt (Obr. 9).



Obr. 9. Vizualizace RT-PCR produktů. Foto A, vzorky 1 – 6 ACLSV infekce, vzorek 7 zdravá kontrola, 8) 100bp DNA ladder marker (Fermentas). Foto B, vzorky 2 a 3 PPV-Rec

Zjišťování rizika rekombinací mezi PPV-Rec a homologním transgenním transkriptem v *P. domestica* L., klon C5.

Principem zjišťování rizika rekombinací mezi PPV-Rec a homologním transgenním transkriptem je sekvenování daného úseku viru, který byl použit k vývoji transgenu, z transgenní a netransgenní části stromu a následné porovnání sekvencí. Pokud je k inokulaci použit pouze jeden izolát viru, neměly by být zjištěny žádné významné rozdíly v obou částech stromu.

Prvním krokem je amplifikace daného úseku pomocí RT-PCR a primerů, které jsou specifické pouze pro PPV-Rec a neamplifikují sekvenci viru PPV-D produkovanou rostlinou samou. Z hlediska rychlosti a spolehlivosti je vhodnější používat one-step-RT-PCR, neboť redukcí kroků je sníženo riziko chyby a kontaminace. Při použití kitu QIAGEN OneStep RT-PCR je protokol následující:

8. 5 µl 5x pufr (konečná koncentrace 2.5 mM $MgCl_2$), 1 µl dNTPs (konečná koncentrace 200 µM každý nukleotid), 1 µl Q roztok, 0.6 µl primeru PPrecR9736 a 0.6 µl primeru PPrecF9245 (Tab. 1) o koncentraci 10 µM, doplnit RNase a DNase prostou H_2O do 23 µl a přidat 2 µl RNA.

9. Podmínky reakce jsou:

XVII) 50°C po dobu 30 min (reverzní transkripce);

XVIII) 95°C po dobu 10 min (aktivace HotStarTaq polymerázy);

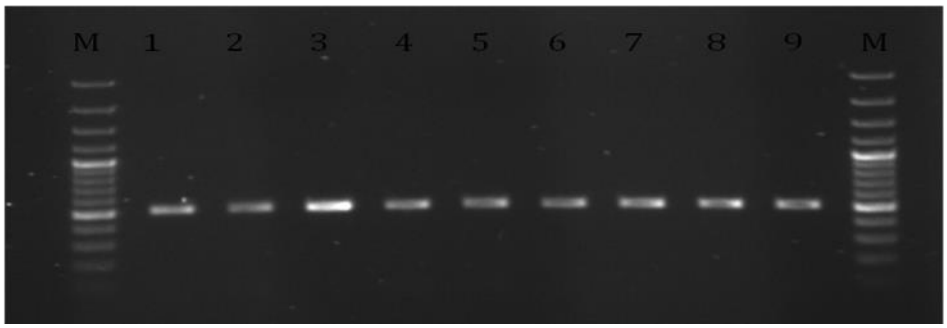
XIX) 35 cyklů ve třech krocích: 94°C po 20 s (denaturace), 60°C po 30 s (dosedání) a 72°C po dobu 1 min (polymerizace);

XX) 72°C po dobu 10 min (konečné prodlužování) a

XXI) 10°C uchovávání.

Vizualizace PCR produktů:

Vizualizace PCR produktů probíhá za pomoci elektroforetického rozdělení fragmentů v agarózovém gelu (je doporučeno použití 1,5 - 2,5 % gelu pro lepší oddělení jednotlivých produktů) s předchozím označením DNA za použitím etidium bromidu, Syber Green, nebo podobného barviva. 5 µl produktu obarveného barvivem je nanášeno na gel a podstoupeno 3-9 V/cm po dobu 60 - 90 min dle velikosti gelu. Produkt primerů PPrecR9736 a PPrecF9245 tvoří 510 bp dlouhý produkt (Obr. 10).



Obr. 10. RT-PCR produkty připravené k sekvenaci. Vzorky 1 – 9 PPV-Rec infekce v transgenní i netransgenní části stromu, M) 100bp DNA ladder marker (Fermentas).

Sekvenování RT-PCR produktů a jejich analýzy:

Sekvenování RT-PCR produktů probíhá v případě absence sekvenovacího zařízení na zakázku u komerčních firem (např. MACROGEN), poskytujících tuto službu. Získané sekvence lze editovat pomoci softwaru SEQUCNCER (Gene Cods Corporation, USA). Sekvence pak porovnávají mezi sebou pomoci softwaru CLUSTAL_X (Thomson et al., 1997). Hodnocení

variability sekvence se provádí pomoci pomocí MEGA3 (Kumar et al., 2004). Úroveň rekombinace sekvence se zjišťuje analýzou pomocí softwaru PHYLPRO (Weiller, 1998).

Výzkumná studie:

Byly porovnány sekvence rekombinačního izolátu PPV z netransgenních části (podnož St. Julien) s PPV sekvence detekované z transgenní části (GM) rostlin. Analýzy sekvence ukázaly naprostou identitu sekvencí obou částí rostlin. Nedošlo k rekombinaci mezi transgenním transkriptem (obalový protein PPV-D) a inokulovaným PPV-Rec. Výsledkem je zjištění, že neexistuje riziko rekombinací mezi virem šarky švestky a homologním transgenním transkriptem v *Prunus domestika* L.,cv. ´HoneySweet´.

Hodnocení možného přenosu transgenu do rostlin rodu *Prunus.*

Úvod.

Monitoring okolí místa pokusu s uváděním GM rostlin do životního prostředí je nařízen zákonem, detaily jsou specifikovány v Rozhodnutí vydaném Ministerstvem životního prostředí. Citace zákona:

(9) Osoba, které bylo uděleno povolení pro uvádění do životního prostředí, je povinna zajistit provádění monitoringu a podávání zpráv o jeho výsledcích v souladu s požadavky stanovenými v povolení.

§18, odst. 9, Zákon č. 78/2004 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty

Rozhodnutí Ministerstva životního prostředí, na základě kterého je monitoring prováděn:

(*platné Rozhodnutí Ministerstva životního prostředí č.j. 96892/ENV/12 ze dne 13. listopadu 2012)*

Požadavky na monitoring a podávání zpráv o jeho výsledcích

Po celé vegetační období budou sledovány všechny nestandardní situace a nahlášeny příslušným úřadům.

Monitoring bude dále prováděn 2 roky po skončení pokusu na místě pokusného uvedení do životního prostředí i v okolí pěstebních ploch, včetně nespecifického monitoringu k odhalení případných neočekávaných účinků GMO na životní prostředí. Po skončení tohoto období bude vypracována zpráva o průběhu a výsledcích monitoringu, tato zpráva bude do 60 dnů od ukončení monitoringu zaslána Ministerstvu životního prostředí v písemné i elektronické podobě.

Případný únik transgenu do životního prostředí bude monitorován jednou měsíčně v období předpokládaného růstu semenáčků slivoní, což je doba od června do srpna. Monitoring bude prováděn do vzdálenosti 1 km, kde nejblíže se vyskytují křížitelné příbuzné rostliny. Pokud bude vzhledem k terénním podmínkám uznáno za vhodné jej rozšířit, pak i dále. Budou vyhledávány jednoleté semenáčky planých slivoní, myrobalánů a trnek a analyzovány průběžně během vegetačního období. Bude prováděn test na gen gus. Přítomnost transgenu bude rovněž kontrolována pomocí RT- PCR s specifickými primery pro detekci PPV-D.

Vlastní metodika monitoringu

Případný únik transgenu do okolí je monitorován především na základě biochemického stanovení přítomnosti markerového genu *gus* (Jefferson *et al*., 1987), který je součástí transgenu (Scorza *et al*., 1994). *Gus* je zkratka genu pro enzym beta-glucuronidase, pocházející z bakterie E. coli. Tento enzym zpracovává bezbarvý substrát na barevný produkt, čímž dochází k vizualizaci jeho přítomnosti ve vzorku.

Nejčastěji používaným substrátem pro *gus* je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc).

1. Monitoring širšího okolí místa pokusu

Ve vegetačním období je nutno hodnotit výskyt kompatibilní vegetace kvetoucí ve stejnou dobu jako GM švestka, jednak výskyt případných semenáčků.

Kvetení

Sledujeme rozkvétání všech rostlin rodu *Prunus* v okolí místa pokusu, tedy především myrobalánů. Jakmile jsou myrobalány v plném květu, začneme sledovat rozkvétání švestek. To začíná dle průběhu vegetace většinou v druhé polovině dubna. GM švestka kvete relativně brzy vzhledem k ostatním švestkám, první květy se otevírají v době konce plného květu až odkvétání myrobalánů. Zároveň s GM švestkou nebo jeden den po ní rozkvétají trnky. 4-6 dní po GM švestce rozkvétá odrůda Jojo. Pravá švestka (odrůda Domácí velkoplodá) rozkvétá 7 dní po GM švestce. Zaznamenáme si, které rostliny rodu *Prunus* kvetly zároveň s GM švestkou. Dokvétající myrobalány není nutno brát v potaz, protože byly opyleny dříve, než se otevřely květy GM švestky. Stejně tak není nutno brát v potaz ty švestky, které otevřely květy 7 dní a později po GM švestce.

Testují se proto plody švestek Jojo a plody trnek. U švestky Jojo, ačkoliv je vysazené v těsné blízkosti GM švestek, nebyl za 4 roky monitoringu prokázán jediný přenos transgenu. Pravděpodobně proto, že rozkvétá o 4 dny později než GM švestka. V tu dobu jsou sice květy GM švestek ještě otevřené, ale pravděpodobně už v tu dobu jsou opylené a potenciální opylující hmyz nepřitahují.

Jediným příbuzným a tedy i potenciálně křižitelným druhem, kvetoucím současně s GM slivoní v pokuse na letišti Ruzyně, je planá trnka *Prunus spinosa*. Vzhledem k odlišné ploiditě slivoně, která je hexaploid (2n = 48) a trnky, která je tetraploid (2n = 32) (OECD 2002) je však možnost vzniku transgennního potomstva u planých trnek blízká nule. U trnky jsou však popsány i další počty chromozómů (2n = 16, 24, 40, 48), takže vzájemnou kompatibilitu se slivoní nelze zcela vyloučit. Testování embryí z pecek trnek prováděné v minulých letech na pracovišti oddělení virologie VÚRV v.v.i. neprokázalo přenos transgenního pylu ani na tohoto hostitele.

U myrobalánů a trnek nutno též vzít v potaz, že včela jako hlavní opylovač schopný přenášet pyl na větší vzdálenost je florokonstantní (např. Hill *et al*., 1997), tedy jedinec létá na jeden druh rostliny tak dlouho, dokud se v přírodě nevyskytuje zdroj hodnotnější. Včela nikdy nenavštěvuje současně dva či více druhů rostlin. Tj. pokud sbírá pyl z jednoho druhu květu, tedy v tomto případě ze švestky, nesbírá zároveň pyl z květů jiného rostlinného druhu, tedy z myrobalánu nebo trnky. Tento fakt dále snižuje pravděpodobnost úspěšného přenosu pylu z transgenních slivoní na trnky a myrobalány. Florokonstantnost je běžnou vlastností i dalších opylovačů, jako jsou např. čmeláci (Chittka et al., 1997; Stout et al., 1998).

Jen nízkou míru úspěšného přenosu GM pylu lze též očekávat, pokud by v blízkosti GM slivoní kvetly ve stejnou dobu jiné odrůdy slivoní. Podle výsledků nedávno publikovaných autory GM slivoně (Scorza et al., 2013) dochází k přenosu transgenního pylu na blízké netransgenní rostliny slivoní zcela ojediněle - bylo detekováno pouze 0.31% transgenních embryí slivoní na nemodifikovaných stromech v okolí z celkového počtu 12 116 testovaných semen.

Počet detekovaných transgenních embryí ještě nemusí odpovídat počtu vyklíčených GM semenáčů, protože je známo, že pecky švestek „málokdy rostou“ (Anonym, 1936).

Výskyt semenáčů

Výskyt případných semenáčů sledujeme během celého roku v okolí rostlin rodu *Prunus* v okolí, tedy myrobalánů, trnek a švestek. Ze všech rostlin odebíráme mladé listy, které laboratorně analyzujeme na přítomnost *gus* genu.

Z každého odebraného listu oddělíme vzorek velikosti cca 4x4 mm (aby se vešel do jamky mikrotitrační desky), který umístíme do jamky mikrotitrační desky. Na každou mikrotitrační desku též umístíme mladé listy odebrané z GM švestky jako pozitivní kontrolu a mladé listy švestek pěstovaných mimo oblast s GM švestkami jako negativní kontrolu.

Po naplnění mikrotitračnich desek listy napipetujeme do každé jamky 100 mikrolitrů roztoku x-gluc, připraveného předem.

Mikrotitrační desky zakryjeme a umístíme do 37°C přes noc.

Druhý den vylijeme gus roztok a naplníme jamky 70% etanolem pro odstranění chlorofylu, který překrývá případné modré zbarvení způsobené gus genem. Mikrotitrační desky opět umístíme do 37°C přes noc. Třetí den vylijeme etanol, napipetujeme znovu 70% etanol a mikrotitrační desky opět umístíme do 37°C přes noc.

Čtvrtý den vylijeme etanol a následuje vyhodnocení. listy ze švestek nesoucí gen *gus* jsou zbarveny modře. Viz obr. 11, zbarvené listy. Horní tři řady jsou listy neobsahující gen *gus*. Ve spodní řadě jsou tři listy modré, z rostliny obsahují gen *gus*. Jde o pozitivní kontrolu, GM švestku.

2. Monitoring přenosu pylu na kompatibilní rostliny

Detekce *gus* genu v plodech švestek a trnek.

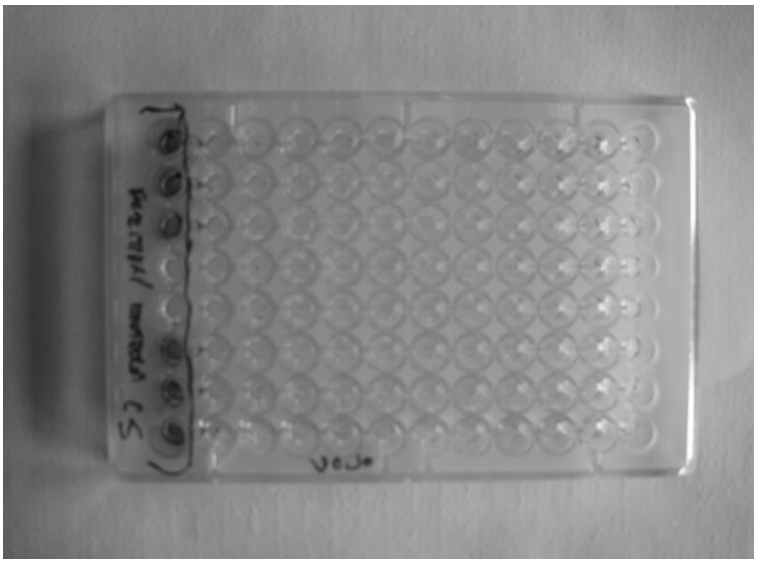
Plody švestek, případně trnek, nasbíráme v době před úplnou zralostí, abychom minimalizovali opad plodů. Sklízíme zvlášť pecky ze švestek odrůdy Jojo a zvlášť z GM švestek. Tyto švestky zrají většinou v průběhu měsíce srpna, GM švestky dříve než odrůda Jojo. Koncem října sklízíme trnky z okolí pokusu s GM švestkou. Plody vypeckujeme, pecky uložíme v chladu. Jakmile shromáždíme všechny pecky od jedné odrůdy, přikročíme k analýze přítomnosti *gus* genu.

Pecku rozlouskneme pomocí kleští kombinaček tak, abychom příliš nepoškodili jádro, zejména na jeho špičce, kde se nachází embryo. U jádra pak například nožem oddělíme dělohy od sebe, čímž odhalíme samotné embryo. To nožem oddělíme od děloh a umístíme do jamky na mikrotitrační desku. Na každou mikrotitrační desku umístíme 8 embryí z plodů Biotech švestek jako pozitivní kontrolu a 4 embrya ze švestek pěstovaných mimo oblast s GM švestkami jako negativní kontrolu. Pokud nemáme k dispozici embrya z GM švestek, použijeme malý kousek mladšího listu.

Po naplnění mikrotitračních desek embryi napipetujeme do každé jamky 50 mikrolitrů roztoku x-gluc, připraveného předem.

Mikrotitrační desku zakryjeme a umístíme do 37°C přes noc.

Druhý den následuje vyhodnocení. Embrya nesoucí gen *gus* jsou zbarvena sytě modře a došlo též k intenzivnímu zmodrání roztoku v jamce. Slabě namodralé zbarvení embryí není pozitivní reakce, jde o nespecifitu. Viz obr. 12, mikrotitrační deska s embryi. Pozitivní kontroly jsou ve vyznačeném sloupci nejvíce vlevo. Na zbytku mikrotitrační desky jsou embrya ze švestek Jojo, rostoucí v těsné blízkosti pokusu s GM švestkou.



Obr. 12. Detekce markerového genu *gus* v embryích semen švestek pomocí biochemického barvení, mikrotitrační deska.
Sloupec desky číslo 1 - zcela vlevo, ohraničený černou barvou: embrya z pecek GM švestky C-5 jako pozitivní kontrola, obsahující gen *gus*. Šest embryí z osmi je zbarveno modře.
Sloupce desky 2-12: embrya z pecek švestky Jojo, rostoucí v těsné blízkosti GM švestek. Celkem 88 embryí, žádné se nebarví modře, protože neobsahuje markerový gen *gus*, tedy ani transgen.

Příprava roztoku X-gluc:

- do 400 ml kádinky odměříme 150 ml destilované vody

- přidáme 4 ml 0,5M zásobního roztoku EDTA (0,744 g na 200 ml vody)

- přidáme 20 ml 1M roztoku $NaH_2PO_4 * H_2O$ (2,76g na 200 ml vody)

- přidáme 0,042 g $K_4Fe(CN)_6 * 3$ H2O

- přidáme 0,200 ml Triton X-100

- mícháme 10 minut, upravíme pH = 7.0

- 100 mg X-Gluc rozpustíme ve 2 ml DMSO, přidáme do připraveného roztoku

- sterilizujeme filtrací

- rozdělíme do kyvet po 25 nebo 50 ml, uskladníme v -20°C

Celkové vyhodnocení, výsledky a závěry získané z polního pokusu, výzkumu rezistence transgenní švestky *P. domestica* L., klon C5 k PPV, ACLSV a PDV.

Dlouholetým hodnocením pokusného sadu Biotech švestky cv. ´HoneySweet´ byly získány významné a komplexní výsledky. Druhý rok po inokulaci PPV-Rec se objevily mírné příznaky šarky na bazálních listech. Přítomnost viru byla potvrzena DAS-ELISA, ISEM a RT-PCR. Od třetího do šestého roku po inokulaci tyto příznaky dále slábly, nebo nebyly vůbec zjištěny, klesala i relativní koncentrace PPV v listech, zatímco na listech výhonů vyrůstajících z netransgenních infikovaných oček použitých jako inokulum přetrvávají silné příznaky šarky a je v nich přítomna vysoká koncentrace viru. V listech některých stromů již není možno PPV prokázat a tyto stromy byly v letech 2007-2010 bez jakýchkoli příznaků šarky. V letech 2011-2013 již nebyly na listech Biotech švestky zjištěny žádné příznaky PPV a výsledky ELISA stanovení byly negativní. Nízký obsah PPV byl v těchto letech zjištěn v bazálních listech některých stromů pomocí RT-PCR. Stejné výsledky byly překvapivě získány i v případě směsných infekcí PPV s PDV a ACLSV, včetně varianty infikované třemi viry PPV-Rec + PDV + ACLSV. Přítomnost obou virů v rostlinách neměla na vznik a intenzitu příznaků PPV žádný vliv. Relativní koncentrace viru šarky švestky klesá v listech stromů se směsnými infekcemi obdobně, jako ve stromech infikovaných pouze PPV-Rec. Další dva viry nezpůsobují na listech stromů žádné příznaky, i když přítomnost ACLSV byla v listech prokázána pomocí ELISA i RT-PCR. Naproti tomu přítomnost PDV nebyla zjištěna. Nebyl pozorován žádný synergistický nebo antagonistický efekt ACLSV na PPV-Rec, zatímco v případě PDV a PPV-Rec se jedná o možnou antagonistickou interakci. Velmi mírné příznaky PPV na malém počtu plodů GM švestky byly pozorovány jen v prvním roce plodnosti a tyto příznaky v době zrání a vybarvení plodů zmizely. Kvalita plodů Biotech švestky cv. ´HoneySweet´ je vysoká, včetně těch, pocházejících ze stromů pod stálým a silným infekčním tlakem PPV a dalších virů, PDV, ACLSV a v řadě parametrů předčí kvalitu kontrolních odrůd ´Stanley´ a ´Jojo´.

Bylo prokázáno, že nehrozí riziko rekombinací mezi transgenním transkriptem (obalový protein PPV-D) a inokulovaným PPV-Rec. Nebyl prokázán přenos transgenu z GM švestky cv. ´HoneySweet´ na žádné rostliny rodu *Prunus* v okolí pokusu.

Výsledky výzkumu dosažené při řešení projektu byly publikovány v impaktovaných a recenzovaných vědeckých časopisech, viz seznamy publikací. Probíhající pokus potvrdil vysokou rezistenci GM rostlin *Prunus domestica* L., cv. ´HoneySweet´ k viru šarky švestky, ale i k dalším významným virům peckovin, PDV a ACLSV. Možnost infekce Biotech stromů cv. ´HoneySweet´ je pouze teoretická, a v ovocnářské praxi nemožná, neboť nikdo nebude stromy infikovat roubováním či očkováním. PPV je na Biotech švestku cv. ´HoneySweet´ mšicemi nepřenosný a při použití rezistentní podnože myrobalán BN4Kr, na kterou je PPV mšicemi také nepřenosný, zůstanou tyto stromy po celou dobu životnosti sadu šarky prosté. Tato skutečnost je radikálním obratem v ochraně proti karantennímu PPV a bude obrovským přínosem pro české

ovocnáře, pokud tato Biotech švestka bude deregulována , a bude moci být volně pěstována tak, jako tomu je v USA od roku 2011.

III) Srovnání novosti postupů.

„Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů a možného přenosu transgenu do rostlin r. *Prunus"* obsahuje komplexní postup hodnocení geneticky modifikované trvalé ovocné kultury v České republice, včetně zjišťování rizika rekombinací mezi PPV a homologním transgenním transkriptem v cv. ´HoneySweet´ a rizika přenosu transgenu ze švestky cv. ´HoneySweet´ na rostliny r. *Prunus* v okolí pokusu. Navazuje na „Metodiku hodnocení rezistence transgenní švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky a ke směsným infekcím s dalšími viry", kde postup hodnocení rezistence geneticky modifikované slivoně transformované s obalovým proteinem genu PPV byl vypracován srovnatelně s postupem hodnocení rezistence odrůd peckovin k viru šarky švestky. Postup zahrnuje hodnocení listů a plodů včetně hodnocení kvality plodů a srovnání této kvality s pěstovanými kontrolními odrůdami. Postup hodnocení osahuje vizuelní hodnocení příznaků PPV, PDV, a ACLSV, imunoenzymatické (DAS-ELISA) hodnocení, imunosorbční elektronovou mikroskopii (ISEM), a molekulární postup stanovení virů pomocí RT-PCR. Hodnocení rezistence zahrnuje vedle viru šarky švestky i další dva hospodářsky významné viry způsobující pseudošarku, ACLSV a PDV, resp. hodnocení kombinovaných infekcí PPV s těmito viry. Několik použitých nezávislých metod a postupů hodnocení rezistence zaručuje maximální spolehlivost výsledku. Metodický postup je možno použít i pro hodnocení dalších geneticky modifikovaných odrůd ovocných druhů a jejich rezistence k rostlinným virům.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky.

Certifikovaná metodika je učena pro Ovocnářskou unii ČR a v ní sdružené podniky, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, pro Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit, pro Ministerstvo životního prostředí a pro odbornou zemědělskou veřejnost. Bude uplatněna při zkoušení švestky *Prunus domestica* L., klon C5, registrované a uvolněné do životního prostředí USA jako cv. HoneySweet, v rámci ÚKZÚZ Brno. Bude využita v rozhodovacích procesech pro uvolnění cv. HoneySweet do životního prostředí v Evropské unii a České republice a následně ovocnáři při pěstování této odrůdy švestky rezistentní k viru šarky švestky v České republice.

V) Ekonomické aspekty

Komplexní metodika hodnocení rezistence GM švestky ´HoneySweet´ k viru šarky švestky (PPV) přináší z hlediska ochrany peckovin, jmenovitě slivoní a pravých švestek zásadní poznatky a vyřešení ochrany předmětných sadů, které do současné doby, během téměř sto let známé existence vysoce škodlivé choroby šarky švestky byly zcela nemyslitelné. PPV je na GM švestku ´HoneySweet´ mšicemi nepřenosný, což bylo prokázáno a publikováno v zahraničí a potvrzeno v našem pokusném sadu. Při kombinaci této odrůdy a všech odrůd křížením z ní vyšlechtěných (rezistence má dominantní charakter podmíněný jedním genem, 50% kříženců je k PPV rezistentních) s podnoží, na kterou je PPV rovněž mšicemi nepřenosný, zůstanou nově vysazené sady prosté šarky po celou dobu jejich existence. Takové podnože jsme objevili, nepřenosnost PPV na ně prokázali a výsledky výzkumu publikovali v zahraničním impaktovaném časopisu Canadian Journal of Plant Pathology (Polák a Komínek, 2014). Sady kvalitních pravých švestek jako např. ´Domácí velkoplodá´ jsou rychle šarkou infikovány a škodlivost viru dosahuje více než 50% (kvalifikovaný odhad), tj. pokud by sad zůstal PPV prostý, byl by výnos plodů za dobu trvání sadu (20-25 let) minimálně dvakrát vyšší. Znetvořené plody z takových sadů jsou pro velmi špatnou kvalitu mnohdy zcela neprodejné. Naše ekonomické hodnocení vychází z oficiálních údajů publikovaných v situačních ovocnářských zprávách. V České republice se ročně sklízí ca 14.800 tun pravých švestek z výměry ca 2000 ha, tj. 7,4 t/ha, rovná se 7400 kg z hektaru. Průměrná realizační cena ovocnáře pěstujícího švestky je 9,80 Kč za jeden kilogram, což je 75.520,- Kč/ha. Pokud by v ČR bylo vysazeno pouze 100 ha rezistentní švestky , tj. 5 % současné výměry, bude průměrný roční přínos ca 7.500.000,-Kč, a za 20 let trvání sadu až 150.000.000,-Kč. Návratnost nákladů na celý tento výzkum bude zajištěna během několika málo let. Celkový finanční přínos pak dosáhne ca 150 milionů Kč minus náklady na výzkum. Přitom kalkulujeme pouze 5 % obměnu z celkové výměry švestek v ČR. Švestky jsou jedinou ovocnářskou komoditou, jejíž výměra v ČR každoročně roste, takže není obava z poklesu zájmu o tento druh ovoce, připočteme-li k tomu i výrobu slivovice v českých likérkách.

Pokud výzkum a šlechtění rezistentních odrůd z GM švestky budou pokračovat, pak by v budoucnu mohlo dojít k nahrazení většiny, nebo celé pěstební výměry slivoní a švestek, a tím de facto k likvidaci výskytu karanténního PPV v českých sadech. Roční celkové finanční přínosy při zdvojnásobení výměry sadů a udržení zahrádkářské a drobné produkce by dosáhly až 5 miliard Kč. Nejedná se o fantazii, ale o reálnou možnost. Proto také Ovocnářská unie ČR uzavírá s VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně písemnou smlouvu o využití výsledků dosažených při řešení výzkumného úkolu NAZV QI101A123, jehož je tato certifikovaná metodika hlavním výstupem. Všechny dosažené výsledky byly také publikovány v řadě původních vědeckých sdělení, viz seznam literatury. Ovocnářská unie ČR se také písemně obrátila na Ministerstvo zemědělství, NAZV s požadavkem na řešení návazného výzkumného projektu, předloženého prof. B. Krškou, ZF Lednice a Doc. J. Polákem, VÚRV v.v.i. Praha, jehož těžištěm je přenos rezistence k PPV z cv. ´HoneySweet´ do odrůdy švestky ´Domácí velkoplodá´.

Poděkování: Odpovědný řešitel výzkumného projektu, jehož je certifikovaná metodika hlavním výstupem, v první řadě děkuje velmi fundovaným a precizním technikům, paní Jitce Pívalové, VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně za stanovení virů pomocí ELISA a relativní koncentrace PPV pomocí semikvantitativní ELISA, v posledních dvou letech tuto práci vykonávala Ing. Marcela Komínková, paní Miloslavě Ducháčové, VÚRV v.v.i. za stanovení intaktních částic PPV pomocí imunosorbční elektronové mikroskopie, a panu Ing. Františku Paprštеinovi, CSc., VŠÚO Holovousy s.r.o. za dodání pylu k opylení stromů ´HoneySweet´ v prvním roce řešení. Kolektiv autorů metodiky vyslovuje poděkování slečně Ing. Evě Svobodové za molekulární diagnostiku virů v letech 2012-2014 podle dříve vypracované metodiky, slečně Ing. Kláře Gogolkové, ZF Lednice za ruční opylování stromů cv. ´HoneySweet´, Ing. Jiřímu Svobodovi, Ph.D. VÚRV v.v.i. za očkování dosadby GM švestky viry PDV a ACLSV, pánům Petru Smutnému a Milanu Jokešovi, VÚRV v.v.i. za celoroční udržování a agrotechniku unikátní pokusné výsadby GM švestky a paní Miloslavě Ducháčové za technické zpracování výsledků a celé metodiky pro tisk.

VI) Seznam použité související literatury.

Anonym, 1936. Výsadba švestek. In: Rádce Předmostí, obrázkový odborný časopis pro zemědělce, chovatele drobného hosp. zvířectva, zahrádkáře a milovníky přírody. Ročník XXIII, strana 410.

Anonym, 2003. Protocol for distinctness, uniformity and stability tests *Prunus domestica* L. european plum, UPOV Species Code: PRUNU_DOM, Adopted on 06/11/2003.

Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. J. Gen. Virol., 34: 51-57.

Chittka L., Gumbert A., Kunze J., 1997. Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movement within and between plant species. Behavioral Ecology 8: 239-249

Glasa M., Palkovics L., Komínek P., Labonne G., Pittnerová S., Kúdela O., Candresse T., Šubr Z. 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. J. Gen. Virol., 85: 2671-2681.

Hill P.S.M., Wells P.H., Wells H. 1997. Spontaneous flower constancy and learning in honey bees as a function of colour. Animal Behavior 54: 615-627.

Jarošová, J., Gadiou, S., Polák, J**.,** Ravelonandro, M., Scorza, R. & Kumar, J. 2010. Evaluation of transgenic *Prunus domestica* L., clone C5 resistance to *Plum pox virus*. Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius Kühn-Institut, Quedlinburg, Germany, 2010: 330-333.

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO journal 6 (13): 3901–7.

Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform, 5:150–163.

Kundu J.K., Briard P., Hily M.J., Ravelonandro M., Scorza R. 2008. Role of the 25-26 nt siRNA in the resistance of transgenic Prunus domestica graft inoculated with plum pox virus. Virus Genes 36: 215-220.

Malinowski T., Zawadzka B., Ravelonandro M., Scorza R. 1998. Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenmic plum by chip-bud inoculation of *Plum pox virus* PPV-S. Acta Virol., 42: 241-243.

Nassuth A., Pollari E., Helmeczy K., Stewart S., Kofalvi S.A. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. J. Virol. Methods 90**:** 37–49.

Polák J., Pívalová J., Jokeš M., Svoboda J., Scorza R., Ravelonandro M. 2005. Preliminary results of interactions of *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwarf virus* (PDV), and *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) with transgenic plants ofg plum *Prunus domestica,* clone C-5 grown in an open field. Phytopatol. Pol., 36: 115-122.

Polák, J., Pívalová, J., Jokeš, M., Svoboda, J., Scorza, R., Ravelonandro, M. 2005b. Preliminary results of interactions of *Plum pox virus* (PPV), *Prune dwart virus* (PDV), and *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) with transgenic plants of plum *Prunus domestica*, clone C-5 grown in a open field. Phytopathologia Polonica, 36: 115-122.

Polák J., Ravelonandro M., Kumar-Kundu J., Pívalová J., Scorza R. 2008a. Interactions of Plum pox virus strain Rec with Prune dwarf and Apple chlorotic leafspot viruses in field growing transgenic plum Prunus domestica L., clone C-5. Plant Protection Science, 44: 1-5.

Polák J., Pívalová J., Kumar-Kundu J., Jokeš M., Scorza R., Ravelonandro M. 2008b. Behaviour of transgenic *Plum pox* virus-resistant Prunus *domestica* L., clone C-5 grown in the open field under a high and permanent infection pressure of the PPV-Rec strain. Journal of Plant Pathology, 90 (1, Supplement): S1.33-S1.36.

Polák J. 2009. Výsledky testování švestky *Prunus domestica* L., cv. Honey Sweet s transgenní resistencí k šarce švestky. Ovocnářské dny, Hradec Králové, 20.-21.1.2009. Přednáška pro ovocnářskou praxi.

Ravelonandro M., Scorza R., Bachelier J.C., Labonne G., Levy L., Damsteegt V., Callahan A. and Dunez J. 1997. Transgenic *Prunus domestica* resistant to plum pox virus infection. Plant Disease, 81: 1231-1235.

Ravelonandro M., Scorza R., Minoiu N., Zagrai I., Platon I. 2002. Field tests of transgenic plums in Romania. Plant´s Health (Spec. Ed.):16-18.

Ravelonandro M., Briard P., Kundu J., Hily J.M., Monsion M., Scorza R. 2008. Silencing in Prunus: A natural defence developed by woody fruit-trees in response to virus infection. Acta Hortic. 781**:** 27-32.

Ravelonandro M., Kundu J., Briard P., Monsion M., Scorza R. 2007. The effect of co-existing *Prunus* viruses on transgenic Plum pox virus resistant plums. Acta Hortic. (The Hague), 738: 653-656.

Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A.M., Cordts J.M., Fuchs M., Dunez J., Gonsalves D. 1994. Transgenic plums *(Prunus domestica* L.) express the *Plum pox virus* coat protein gene. Plant Cell Rep., 14: 18-22.

Scorza R., Callahan A.M., Levy L., Damsteegt V., Ravelonandro M. 2001. Resistance to *Plum pox potyvirus* in a transgenic woody perennial fruit tree, European plum (*Prunus domestica* L.) result from post-transcriptional gene silencing. Acta Hortic. (The Hague), 550: 425-430.

Scorza R., Kriss A.B., Callahan A.M., Webb K., Demuth M., Gottwald T. 2013. Spatial and temporal assessment of pollen- and seed-mediated gene flow from genetically engineered plum *Prunus domestica*. PLoS ONE 8(10): e75291. doi:10.1371/journal.pone.0075291.

Šubr Z., Pittnerová S., Glasa M. 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates. Acta Virologica, 48: 173-176.

Thomson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies formultiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25: 4876–4882.

Vachůn, Z., Krška B., Sasková H.a Oboňová J. 1991. Metodika hodnocení fenologických, pomologických a pěstitelských znaků (vlastností) meruňkových odrůd a hybridů. (Metodika je určena pro interní hodnocení genotypů ve staničních zkouškách a u vybraných vlastností i u genotypů v hybridních sadech). Zahradnická fakulta Lednice, 1991.

Weiller G. F. 1998. Phylogenetic Profiles: A Graphical Method for Detecting Genetic Recombibations in Homologous Sequences. Molecular Biology and Evolution 15: 326-335.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice.

Polák J. 2012. Biotechnological (GM) crops in the world and Europe, plum HoneySweet resistant to PPV, research in the CR: the past, the presence, and the future. Visnyk - biologija: 32-36.

Polák J. 2012. Současný stav komercializace a výzkumu biotechnologických (GM) plodin ve světě, v Evropě a České republice. Rostlinolékař 4/2012: 32-34.(in Czech)

Polák J., Kumar J., Krška B. 2012. Biotech plodiny ve světě, deset let výzkumu švestky ´HoneySweet´ v ČR a dva roky hodnocení kvality plodů. Úroda 60: 104-110. (in Czech)

Polák J., Kumar J., Krška B. 2012. Resistance of biotechnological plum *Prunus domestica* L. cv. 'HoneySweet' to the *Plum pox virus* and other viruses. Zahradnictví, 11: 14-15. (in Czech)

Polák J., Kumar J., Krška B., Ravelonandro M. 2012. Biotech/GM crops in horticulture: Plum cv. HoneySweet resistant to *Plum pox v*irus. Plant Protection Science 48, Special Issue: S43-S48.

Polák J., Kumar J., Krška B., Ravelonandro M., Scorza R. 2012. The present status of commercialized and developed biotech (GM) crops, results of evaluation of plum HoneySweet for resistence to plant viruses in the Czech republic. Petria 22: 381-387.

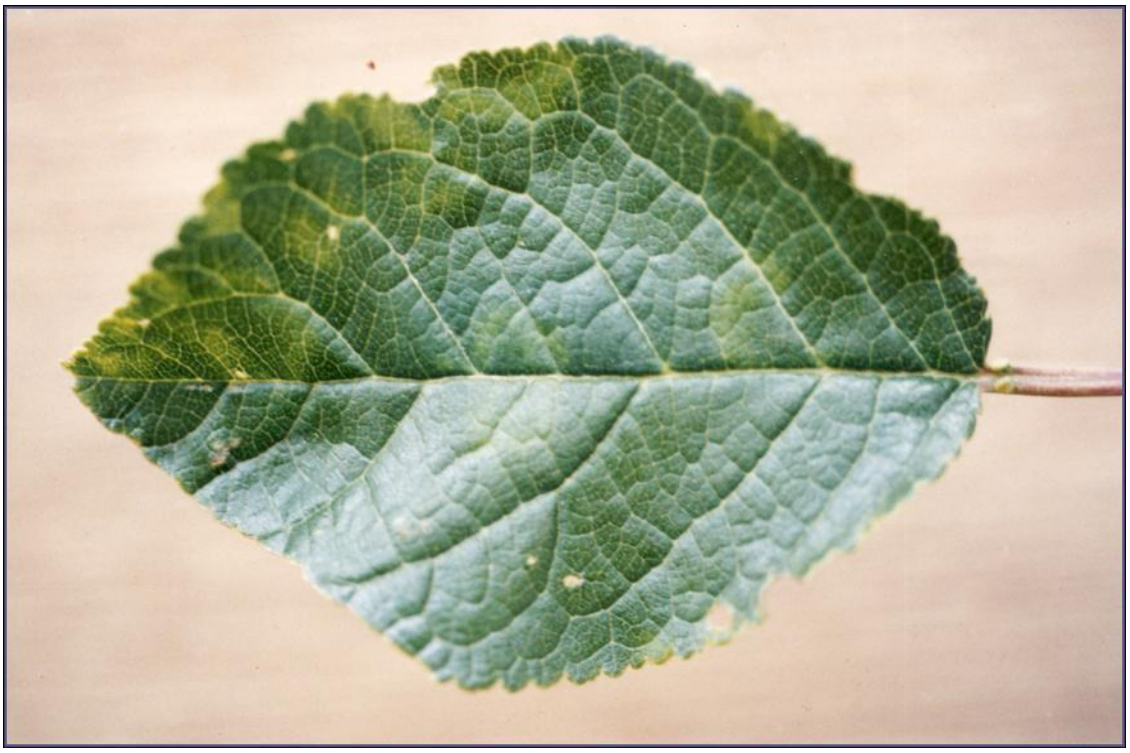
Jarošová, J., Gadiou, S., Polák, J., Ravelonandro, M., Scorza, R. & Kumar, J. 2010. Evaluation of transgenic *Prunus domestica* L., clone C5 resistance to *Plum pox virus*. Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius Kühn-Institut, Quedlinburg, Germany, 2010: 330-333.

Ravelonandro M., Scorza R., Polák J**.,** Callahan A., Krška B., Kundu J, Briard P. 2013. HoneySweet Plum-A Valuable Genetically Engineered Fruit-Tree Cultivar. Food and Nutrition Sciences 4: 45-49.

Scorza R., Callahan A., Dardick C., Ravelonandro M., Polák J., Malinowski T., Zagrai I., Cambra M., Kamenova I. 2013: Genetic engineering of *Plum pox virus* resistance: ´HoneySweet´ plum – from concept to product. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 115: 1–12.

Obr. 1. Řady stromů švestky *P. domestica* L., cv. ´HoneySweet´ infikovaných kombinacemi virů, 2005.

Obr. 2. Zdravé kontrolní stromy švestky *P. domestica* L., cv. ´HoneySweet´, 2010.



Obr. 3. Mírné difuzní skvrny způsobené PPV na listu cv. ´HoneySweet´ druhý rok po inokulaci.

Obr. 4. Velmi mírné 2 difuzní skvrny na listu cv. ´HoneySweet´ pátý rok po inokulaci.

Obr. 5. Silné žluté skvrny a kroužky na listu zdroje infekce, 2. rok po inokulaci PPV.

Obr. 6. Silné žluté skvrny a kroužky na listu zdroje infekce, 5. rok po inokulaci PPV.

Obr. 7. Porovnání plodů švestky odrůdy ´Jojo´ (horní řada) a švestky cv. ´HoneySweet´ (dolní řada).

Obr. 11. Detekce markerového genu *gus* v listech pomocí biochemického barvení.
Horní tři řady - lístky trnek z okolí pokusu, neobsahující gen *gus*.
Nejsou zbarveny modře.
Spodní řada – lístky z GM švestky C-5 jako pozitivní kontrola, tedy obsahující gen *gus*.
Jsou zbarveny modře.