

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



Bakalářská práce

Citlivost hybridního šťovíku k virovým
infekcím

Anna Týcová
2008

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Bakalářská práce

Týcová, A., 2008: Citlivost hybridního šťovíku k virovým infekcím. [Susceptibility of a hybrid sorrel to viral infections. Bc. Thesis, in Czech.] – 26 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The sorrel of Uteush was infected by Radish mosaic virus and Turnip yellow mosaic virus by a mechanical sap transmission. Symptoms of infection were observed. The presence of viruses were confirmed by PCR and sequencing.

Tato práce byla financována z prostředků projektu GAČR č. 522/07/0053 a z prostředků Katedry genetiky PřF JU.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Karlu Petrzikovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady i za vstřícnost a trpělivost, se kterou vedl mou práci, a také kolektivu laboratoře Rostlinné virologie za ochotnou pomoc.

Obsah

ÚVOD	5
Fytoenergetika.....	5
Zdroje biomasy	5
Šťovík Uteuša	6
Radish mosaic virus	8
Turnip yellow mosaic virus	9
Virózy na rodu šťovík	10
Cíl práce	10
MATERIÁL A METODY	11
Rostlinný materiál	11
Izolace RNA.....	11
RT-PCR.....	12
PCR.....	12
Sekvenování – RaMV	13
Klonování – TYMV	15
VÝSLEDKY A DISKUSE	17
ZÁVĚR	18
POUŽITÉ ZKRATKY	19
POUŽITÁ LITERATURA	20

ÚVOD

Fytoenergetika

Současná situace využívání energetických zdrojů směřuje jednoznačně ke hledání nových netradičních zdrojů, včetně zdrojů obnovitelných. Tradiční fosilní zdroje jsou limitovány, neboť jsou vyčerpatelné. Z obnovitelných zdrojů energie má největší význam biomasa, protože zaujímá až 75% v rámci všech obnovitelných forem energie (voda, vítr, solární energie apod.). Její výhodou je i to, že ji lze „konzervovat“ – může se usušit, uskladnit a použít v době, kdy je potřeba (Petříková, 2002b).

Využíváním biomasy pro energii tak u nás vzniká zcela nový obor – fytoenergetika, která netradičně navazuje přímo na zemědělskou činnost (Petříková, 2003b). Pěstování plodin pro energetické a technické účely má velký ekologický význam projevující se v omezení skleníkového efektu, ve snížení prašnosti v ovzduší a v omezení zaplevelenosti území. Další příznivý efekt spočívá ve vzniku nových pracovních příležitostí. Výsledným produktem energetických plodin jsou biopaliva (fytopaliva), která mohou být tuhá (řezanka, balíky, brikety, pelety), tekutá (rostlinné oleje, bionafta, bioetanol) nebo plynná (bioplyn) (Uš'ak, 2000a).

Zdroje biomasy

Energetická biomasa se nejčastěji využívá ve formě nejrůznějších odpadních hmot organického původu, nebo vedlejších produktů. Jedná se především o dřevní či lesní odpady nebo slámu: obilní, řepkovou, kukuřičnou apod. Využívání odpadních hmot je nejlevnější zdroj biomasy. S rostoucím počtem nově budovaných biokotelen se ale již vyskytují signály o nedostatku lesních a dřevních odpadů. S tím souvisí obvykle i jejich vzrůstající cena (Petříková, 2005a).

Záměrné pěstování rostlin pro energetickou biomasu má stále větší význam. Poměrně známé jsou plantáže rychle rostoucích dřevin, které se zakládají i u nás, ale jsou rozšířeny hlavně v zahraničí (Petříková, 2005a). V současných ekonomických podmínkách není pěstování vhodné pro velkoplošné uplatnění v ČR, neboť rychle rostoucí dřeviny vyžadují vysoký podíl ruční práce, nebo obrovské investice do moderní specializované techniky (Uš'ak, 2000b). Mají místo zejména ve vlhkých podmáčených půdách, neboť se jedná zpravidla o vrby či topoly. Jejich porosty se mohou doplňovat

s energetickými plodinami bylinného charakteru, z nichž mnohé naopak podmáčené půdy nesnáší (Petříková, 2003a).

Méně známé jsou energetické rostliny bylinného charakteru (např. laskavec *Amaranthus* L., pupalka dvouletá *Oenothera biennis* L., čičorka pestrá *Coronilla varia* L.) (Petříková, 2002a). Z těchto rostlin jsou nejdůležitější rostliny víceleté a vytrvalé. Jejich výhodou je snížení nákladů na pěstování, kdy není třeba každoročně nově porost zakládat a provádět veškeré kultivační práce, které jednoleté plodiny jinak vyžadují, včetně setí a každoročního nákupu osiv (Petříková, 2002a). Snižují se náklady na hnojení a chemickou ochranu (Ušťak, 2000a). Další nesporná výhoda vytrvalých rostlin je jejich protierozní působení, které se jinak při každoroční orbě může často objevit a poškodit tak půdu a zasáhnout mnohdy negativně i do ekologie celé krajiny. Jako nejperspektivnější energetická plodina se jeví krmný šťovík (Petříková, 2002a).

Šťovík Uteuša

Krmný (energetický) šťovík, Rumex OK-2, je v naší odborné veřejnosti znám pod pojmem „šťovík Uteuša“, neboť jeho šlechtitelem byl prof. Uteuš z Akademie věd v Kyjevě. Jeho spoluautor a současný reprezentant této odrůdy je prof. Rachmetov, z téže instituce. Krmný šťovík je řádně vyšlechtěná plodina, vzniklá křížením šťovíku zahradního a t'janšanského (*Rumex patientia* x *Rumex tianschanicus* A.Los.). Byl vyšlechtěn jako vysoce kvalitní krmná pícnina (Petříková, 2007). Dále je velmi významný jako zelenina, léčivá i technická rostlina. Hybrid je velmi raný, poskytuje vysokou produkci, vysoký obsah bílkovin a vitaminů (Petříková, 2003c). Zárukou jeho vysoké kvality je šťovík zahradní, vysoká vzrůstnost a tolerance vůči nepříznivým povětrnostním vlivům je dána šťovíkem t'janšanským (Kára, Petříková, 2007).

Šťovík krmný je vytrvalá plodina, neboť může vydržet na svém stanovišti 15 až 20 let, což je z hlediska fytoenergetiky bezpochyby velmi výhodné. Je to statná, vysoká rostlina, která od 2. roku po založení kultury má silnou rozvětvenou lodyhu, která dosahuje 1,5 až 2 m výšky. Je odolný vůči vymrzání (Petříková, 2002b).

V ČR byl založen první porost šťovíku v pokusných podmínkách v roce 1992 a od té doby stále na této parcele každoročně obrůstá. Nejstarší velkoplošná kultura byla u nás založena v roce 2000. Do roku 2005 bylo oseto v ČR celkem asi 1300 ha, což je zatím největší plocha ze všech rostlin pěstovaných pro energetické účely v ČR. Plně zapojený porost tohoto energetického šťovíku je v provozu závislý zejména na způsobu jeho

založení a na jeho ošetřování během vegetace. Půdně-klimatické podmínky nejsou nijak vyhraněné, byl úspěšně pěstován až do výšky 650 m n. m. Daří se mu v různých půdních typech, pouze podmáčené půdy s vysokou hladinou spodní vody mu nevyhovují. Hluboký kořen ve stojaté vodě zahnívá a celá rostlina pak odumře. Díky tomuto hlubokému kořenovému systému sice poměrně dobře odolává suchu, ale při jeho vzcházení je dostatek vláhy nezbytný (Petříková, 2005b).

Bylo stanoveno, že je náročný na hnojení pouze v prvních dvou letech, kdy rozdíly mezi nehnojenými a hnojenými variantami jsou nejvyšší. V dalších letech se tyto rozdíly nivelují a činí v dlouhodobém průměru cca 3 tuny sušiny nadzemní hmoty z jednoho ha. Navíc prakticky nejsou rozdíly ve výnosech mezi dávkou 60 a 120 kg účinných látek NPK (v průměru pouze cca 0,3 tuny/ha), což znamená, že tato plodina je málo náročná na hnojení (tab. 1). Při jednorázové roční sklizni v suchém stavu stabilně poskytuje v průměru cca 14 – 16 tun suché nadzemní hmoty, což dokonce převyšuje úroveň běžně dosahovaných výnosů rychle rostoucích dřevin (cca 12 – 14 tun/ha v přepočtu na rok). Výhodou pěstování a sklizně je vysoká technologičnost, možnost použití běžné zemědělské techniky a nízké provozní náklady (Usťak, 2000b).

Tab. 1: Průměrné výnosy šťovíku Uteuša od doby založení porostu (rok 1992) v závislosti na různých dávkách minerálního hnojení (Usťak, 2000b)

Hnojení	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Průměr 1993 - 2001
Kontrola	0,6	6,7	13,4	15,1	14,2	12,4	11,9	14,6	8,6	10,6	12,1
NPK-60	1,8	11,6	15,2	16,7	15,8	15,9	17,3	16,6	14,9	14,2	15,5
NPK-120	2,6	10,9	16,4	17,2	16,4	14,9	15,5	20,0	15,2	15,3	15,8
Průměr variant	1,7	9,7	15,0	16,3	15,5	14,4	14,9	17,1	12,9	13,4	14,4

Využití šťovíku pro energetické účely může být i kombinované: sklizeň suché hmoty pro vytápění v kotelnách či k výrobě pevných biopaliv (brikety, pelety), kdy se sklízí šťovík zralý a v podstatě suchý začátkem července a pak na zeleno, koncem srpna či začátkem září pro využití v bioplynové stanici nebo ke krmení (Petříková, 2006). Zvýšila se doживost i přírůstky mladého dobytka na výkrmu. U nás je sice zelené píče až nadbytek vzhledem ke snižovaným stavům skotu (proto se v ČR začal tento šťovík využívat především pro energetické účely, Petříková, 2007), ale tráva z trvalých travních porostů neskýtá často dostatečnou kvalitu (Kára, Petříková, 2007). Po letní sklizni na suchou hmotu začne rychle obrůstat. Nevytvoří se již lodyhy, ale jen přízemní růžice zelených listů (Petříková, 2006).

Pro fytoenergetické účely, k přímému spalování, se sklízí celá nadzemní hmota šťovíku, včetně semene. Termín sklizně je nejvhodnější v období těsně před plnou zralostí

tak, aby byly lodyhy již dostatečně vyschlé a aby se přitom semena nevydrolila. Přítomnost semen je zárukou vysoké výhřevnosti této energetické biomasy. Suchá fytomasa šťovíku krmného má značný energetický obsah. Měřeními spalného tepla byly stanoveny hodnoty kolem 17,5 až 18 MJ/kg suché hmoty (Petříková, 2002b). Energetická výtěžnost je 275 GJ/ha na průměrný výnos 15 tun sušiny z 1 ha. Pro srovnání, jeden rodinný domek spotřebuje ročně cca 75-100 GJ energie, což znamená, že 1 ha šťovíku zabezpečí potřeby cca 3 rodinných domků venkovského typu (Ust'ak, 2000b).

Na ochranu proti zaplevelení je vysoce náročný pouze v prvním roce pěstování, v dalších letech tato raná plodina potlačí prakticky veškeré plevele, a proto nepotřebuje žádnou ochranu. Výskyt škůdců (především zlatohlávek a dřepčák) byl pozorován poměrně často, ale většinou v pozdějších stádiích růstu, kdy už nemohl zásadně ovlivnit výnosy, a proto nevyžadoval aplikaci chemických postřiků. Nicméně v případě výskytu škůdců v raných stádiích růstu (mandelinka ředkvičková, Petříková, 2003c) je nutno počítat i s chemickou ochranou porostu šťovíku (Ust'ak, 2000b).

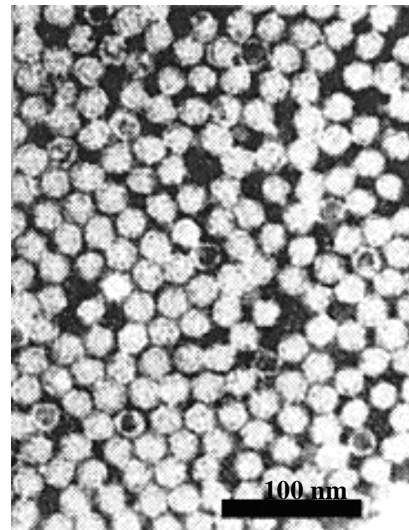
Rumex OK-2 není vhodný pro pěstování ve směsích s jinými rostlinami, a proto není schopný se samovolně rozvíjet v přírodních podmínkách. Po 3 - 4 letech z porostu šťovík zmizel. Proto se nemůže ani udržet v přirozeném porostu v okolí pěstitelské plochy, i kdyby zde semeno šťovíku vzešlo. Šťovík je samosprašná rostlina. Spontánní hybridy s jinými druhy šťovíků a nebo s příbuznými rostlinami se v přírodní flóře netvoří. Plod Rumexu OK-2 je tříhranná nažka, poměrně těžká (hmota 1000 semen je 4 – 5 gramů). Biologická charakteristika semene neumožňuje jeho rozšiřování na větší vzdálenosti. Semena nemají dormanci – vzcházejí ihned po nabobtnání, a proto nevytváří zásobu semen v půdě. Hned po zasetí jsou semena schopna vzejít na 100%. Snadno se proto v případě potřeby zničí mechanickým ošetřením. Šťovík hybridní má křovitý větvičí se kořenový systém. Nevytváří kořenové odnože ani oddenky, a proto není schopen se v kultuře ani v přírodě množit vegetativně. Víceleté plantáže se snadno likvidují mechanicky během jednoho vegetačního roku, nebo jednorázovým použitím herbicidů (Petříková, 2003a).

Radish mosaic virus

Radish mosaic virus (obr. 1) patří do rodu *Comovirus*. Virový izometrický kapsid je neobalený, kulatý s kubickou symetrií. V průměru je velký asi 30 nm.

Genom je segmentovaný. +ssRNA je rozdělena na RNA-1 a RNA-2. Celý genom má 9800 nukleotidů (ICTVdB Management, 2006a). Je známá sekvence RNA-1 (GenBank AB295643), RNA-2 (GenBank AB295644) a genu pro RNA polymerázu (Petrzik, Holá, Špak, 2005).

Infikuje většinu brukvovitých, u nichž způsobuje mozaiku, kroužkovitost (chlorotickou nebo nekrotickou), žilkovou nekrózu, kadeřavost listů a občas systémovou nekrózu. U další hostitelů, kteří patří mezi lilkovité, merlíkovité a tykvovité, vyvolává tvorbu lokálních lézí. U *Raphanus sativus* cvs. White Icicle, Chinese White Winter způsobuje systémovou skvrnitost obvykle s kroužkovitostí (enace se objevují později) a u *Chenopodium amaranticolor* nekrotické lokální léze (Adams, Antoniow, 2006). České izoláty RaMV1, BOR1, CB3, CB6 a CB8 ale žádné příznaky na *Raphanus sativus*



Obr. 1: Radish mosaic virus
<http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=121&figno=08>

cv. Slavia a *Chenopodium amaranticolor* nevyvolávají. Nejčastější reakcí zkušebních rostlin na tyto české izoláty jsou lokální nekrotické léze. U *Sinapis alba* vyvolávají nekrózu a chlorotické kroužky. U *Brassica napus* var. *silvestris* cv. Perko způsobují zakrslost a systémovou mozaiku. Izolát CB6 se nejčastěji projeví při systémové infekci chlorotickými kroužky (Špak, Kubelková, 2000).

Turnip yellow mosaic virus

Turnip yellow mosaic virus (obr.2) patří do rodu *Tymovirus*. Izometrický kapsid viru je neobalený, kulatý s kubickou symetrií. Jeho průměr je 29,2 – 31,8 nm (ICTVdB Management, 2006b).

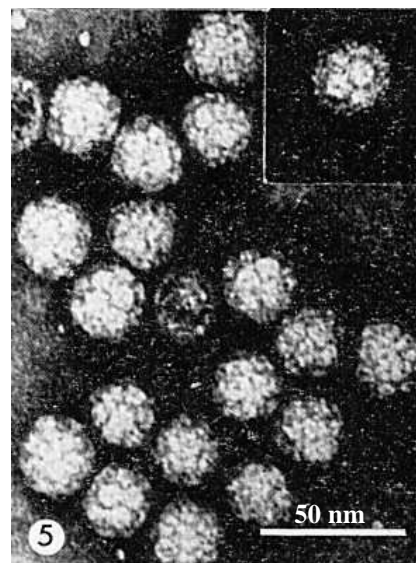
Genom je tvořený monopartitní +ssRNA. Celý genom je 6319 nukleotidů dlouhý (ICTVdB Management, 2006b). Je známá kompletní nukleotidová sekvence genomu (GenBank NC_004063).

Známe rozmezí hostitelů je omezeno na brukvovité a na druhy *Reseda odorata* (*Resedaceae*) a *Cleome spinosa* (*Capparodaceae*). Mnoho kmenů způsobuje na *Brassica pekinensis* jasně žlutou nebo zelenožlutou mozaiku, ale jiné kmeny mají mírnější příznaky (Adams, Antoniow, 2006).

Po inokulaci československými izoláty TYMV 1, 2, 3, 4, 5, 6 docházelo na inokulovaných listech brukvovitých rostlin k tvorbě lokálních nekrotických nebo chlorotických lézí, v některých případech zůstávaly listy bez příznaků infekce. Systémová infekce se u vodnice, pekingského zelí, hořčice bílé, hořčice černé a řepky projevovala nejprve drobnými tmavě a světle zelenými skvrnami, které postupně přecházely ve výraznou systémovou mozaiku. Mozaika se projevowała ostře ohraničenými žlutozelenými až žlutobílými skvrnami (Špak, Polák, 1988).

Naproti tomu u variet brukve zelné *Brassica oleraceae* L. se v počátečních fázích systémové infekce objevovaly drobné chlorotické skvrny, nepravidelně rozmístěné mezi listovými žilkami a podél nich. Příznaky byly velmi mírné a se stárnutím rostliny se často zcela ztrácely. Variety *capitata* (zelí), *gongylodes* (brukev) a *sabauda* (kapusta) byly vůči některým izolátům TYMV zcela odolné (Špak, Polák, 1988).

Většina brukvovitých indikátorových rostlin reagovala na typový kmen TYMV (z Holandska) lokálními lézemi a systémovou mozaikou, pouze kapusta (*B. oleracea* var. *sabauda*, odrůda ‚Železnohlávka‘) byla odolná. Československé izoláty, s výjimkou izolátu 6, vytvářely na resedě prosvětlování listových žilek až systémovou mozaiku. *Nicotiana tabacum* L. a *Chenopodium murale* L. nejsou hostitelé Turnip yellow mosaic virus (Špak, Polák, 1988).



Obr. 2: Turnip yellow mosaic virus
<http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=2&figno=05>

Virózy na rodu šťovík

Rod *Rumex* infikují Dock mottling mosaic potyvirus a Tobacco vein mottling potyvirus. *R. acetosa* je hostitelem Clover wound tumor phytoreovirus, Cucumber mosaic cucumovirus a Red clover necrotic mosaic dianthovirus. Tento druh šťovíku neinfikují Squash mosaic comovirus, Sunn-hemp mosaic tobnavirus a Watermelon curly mottle bigeminivirus (Brunt *et al.*, 1996).

Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit, zda může být hybridní šťovík Uteuša hostitelem izometrických virů rodů Comovirus a Tymovirus.

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál

Šťovík Uteuša byl pěstovaný ze semen ve skleníku od ledna do října. Ve stádiu dvou až tří listů byly rostliny infikovány mechanickým přenosem šťávou. Šest rostlin bylo naočkováno izolátem RaMV1 viru mozaiky ředkvičky RaMV. Purifikovaný vir byl získán od vedoucího práce. Šest rostlin bylo naočkováno izolátem Ruzyně viru žluté mozaiky vodnice TYMV pocházející ze sbírky oddělení Rostlinné virologie Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR. Asi 1 cm² listu zelí pekingského infikovaného tímto virem byl homogenizován s fosfátovým pufrům. Inokula byla nanesena na listy, které pak byly opláchnuty destilovanou vodou.

Izolace RNA

RNA byla izolována podle návodu RNA Blue (Top-Bio).

- 100 mg listů bylo homogenizováno s 1 ml RNA Blue
- homogenát byl přenesen do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a inkubován 5 min při pokojové teplotě
- do zkumavky bylo přidáno 0,2 ml chloroformu
- vzorek byl protřepán a inkubován 5 min při pokojové teplotě
- po centrifugaci při 12 000 x g po dobu 10 min při 4°C byla horní bezbarvá vodní fáze přenesena do nové zkumavky
- RNA byla precipitována přidáním 0,5 ml izopropylalkoholu a inkubována 10 min při 4°C
- po centrifugaci při 12 000 x g po dobu 10 min při 4°C se RNA nacházela na dně a po stranách zkumavky
- supernatant byl odstraněn a k RNA byl přidán 1 ml 75% etanolu, zkumavka byla protřepána
- centrifugaci po dobu 5 min při 4°C RNA sedimentovala, supernatant byl odstraněn
- sediment byl vysušen na centrivapu 10 min
- RNA byla rozpuštěna v 50 µl H₂O

RT-PCR

Reverzní transkripce byla provedena v reakční směsi:

pufr 5x	2 µl
MMLV (Promega)	0,5 µl
RNA	1 µl
dNTP	0,5 µl
inhibitor	0,5 µl
hexamer	0,5 µl
voda	5 µl
celkem	10 µl

Syntéza cDNA podle virové RNA probíhala podle programového schématu (PTC-200 Peltier Thermal Cycler; MJ Research):

30 min při 37°C

3 min při 94°C

PCR

Amplifikace cDNA viru mozaiky ředkvičky byla provedena v reakční směsi:

PPP mix (Top-Bio)	10 µl
primer 347R2	0,5 µl
(5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3')	
primer 248I5	0,5 µl
(5'- TTGGTATGCTGGAAACCGAG -3')	
cDNA	0,5 µl
voda	8,5 µl
celkem	20 µl

podle programového schématu (MiniCycler™; MJ Research):

30 cyklů: 30 s při 93°C

30 s při 50°C

30 s při 72°C

10 min při 72°C

Amplifikace cDNA viru žluté mozaiky vodnice byla provedena v reakční směsi:

PPP mix (Top-Bio)	10 µl
primer 109N0	0,5 µl
(5'- TGGTCGGGAAAGCTGGGGC -3')	
primer 109M9	0,5 µl
(5'- CCGGCCCATCACCTCTCACC -3')	
cDNA	0,5 µl
voda	8,5 µl
celkem	20 µl

podle programového schématu (PTC-200 Peltier Thermal Cycler; MJ Research):

30 cyklů:	10 s při 94°C
	10 s při 58°C
	20 s při 72°C
	10 min při 72°C

Pro kontrolu produktu byla použita agarózová gelová elektroforéza:

- 0,4 g agarózy byly rozpuštěny v 25 ml 0,5 x TBE pufru (pro RaMV) a 0,5 g agarózy byly rozpuštěny v 25 ml 0,5 x TBE pufru (pro TYMV)
- do jednotlivých zubů gelu byly naneseny vzorky a marker (FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range; Fermentas Life Science), které byly obarveny fluorescenčním barvivem syber green
- elektroforéza probíhala v 0,5 x TBE pufru při 100 V

Sekvenování – RaMV

K extrakci DNA produktu z gelu byl použit GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma):

- k vyřezanému gelu s DNA produktem bylo přidáno třikrát více Gel Solution (300 µl Gel Solution na každých 100 mg gelu)
- směs byla inkubována při 56°C 10 min a každé 3 min byla protřepána
- do kolonky bylo napipetováno 0,5 ml Column Preparation Solution, kolonka byla centrifugována

- k rozpuštěnému gelu byl přidán izopropylalkohol o objemu jedné třetiny Gel Solution a směs byla přenesena do kolonky
- po centrifugaci bylo přidáno 0,5 ml Wash Solution s etanolem
- vzorek byl dvakrát centrifugován
- všechny centrifugace probíhaly 1 min při 12 000 x g a látky, které se nezachytily na membráně kolonky byly odstraněny
- kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky Eppendorf
- DNA byla vymyta přidáním 30 μ l nahřátého elučního pufru
- vzorek byl inkubován 1 min a poté centrifugován 3 min při 14 000 x g

Sekvenční reakce:

mix (Amersham)	1,6 μ l
pufr	4 μ l
primer 248I5	1 μ l
PCR produkt	10 μ l
voda	3,4 μ l
celkem	20 μ l

Programové schéma (SwiftTM Maxi Thermal Cycler; Esco):

30 cyklů:	10 s při 96°C
	5 s při 50°C
	4 min při 60°C

Precipitace

- k 20 μ l produktu bylo přidáno 80 μ l 75% izopropanolu
- vzorek byl inkubován 15 min při 20°C a potom centrifugován 15 min při 14 000 x g a 4°C
- supernatant byl odsán a do zkumavky bylo přidáno 0,25 ml 75 % izopropanolu, protřepáno
- po centrifugaci při 14 000 x g po dobu 5 min při 4°C byl supernatant odsán a vzorek vysušen na centrivapu 15 min

Klonování – TYMV

Amplifikované produkty byly klonovány pomocí Gene JET™ PCR Cloning Kit (Fermentas Life Science).

Reakční směs:

2x Reaction Buffer	5 µl
PCR produkt (nepurifikovaný)	2 µl
voda	1,5 µl
DNA Blunting Enzyme	0,5 µl
celkem	9 µl

- vzorek byl protřepán a centrifugován 3 – 5 s, poté byl inkubován 5 min při 70°C a několik sekund při 4°C
- bylo přidáno 0,5 µl pJET1/blunt Cloning Vector a 0,5 µl DNA Ligase
- tato ligázová směs byla zamíchána a centrifugována 3 – 5 s
- směs byla inkubována 5 min při pokojové teplotě

- k TOP 10 buňkám bylo přidáno 2,5 µl ligázové směsi
- buňky byly inkubovány 10 min při 4°C, potom byly vystaveny tepelnému šoku po dobu 30 – 45 s a opět inkubovány při 4°C
- k buňkám bylo přidáno 200 µl c-media, vzorek byl promíchán
- na živný agar s ampicilinem bylo vyseto 50 µl a 200 µl vzorku
- vzorky byly inkubovány 16 hodin při 37°C v termostatu

Kontrola obsahu bakteriálních kolonií

Reakční směs:

PPP mix (Top-Bio)	10 µl
primer pJET1 f (5'- GCC TGAACACCATATCCATCC -3')	0,5 µl
primer pJET1 r (5'- GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGA TC -3')	0,5 µl
voda	9 µl
vzorek na špičce párátka z kolonie na Petriho misce	

Programové schéma:

30 cyklů: 20 s při 92°C
30 s při 50°C
30 s při 72°C

Pro kontrolu produktu byla použita agarózová gelová elektroforéza (0,5 g agarózy byly rozpuštěny v 25 ml 0,5 x TBE pufru, barveno syber green). Pro sekvenaci byl vybrán vzorek č. 3, který obsahoval nejvíce PCR produktu.

Sekvenční reakce:

mix (Amersham)	1,6 µl
pufr	4 µl
primer pJET1 f	1 µl
PCR produkt	1 µl
voda	12,4 µl
celkem	20 µl

Programové schéma (SwiftTM Maxi Thermal Cycler; Esco):

30 cyklů: 10 s při 96°C
5 s při 50°C
4 min při 60°C

Precipitace:

- k 20 µl produktu bylo přidáno 80 µl 75% izopropanolu
- vzorek byl inkubován 15 min při 20°C a potom centrifugován 15 min při 14 000 x g a 4°C
- supernatant byl odsán a do zkumavky bylo přidáno 0,25 ml 75 % izopropanolu, protřepáno
- po centrifugaci při 14 000 x g po dobu 5 min při 4°C byl supernatant odsán a vzorek vysušen na centrifapu 15 min

VÝSLEDKY A DISKUSE

Následující pasáž o rozsahu pěti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

ZÁVĚR

Hybridní šťovík Uteuša byl naočkován mechanickou inokulací izolátem RaMV1 viru mozaiky ředkvičky RaMV a izolátem Ruzyně viru žluté mozaiky vodnice TYMV. Po 9 měsících nebyly na listech pozorovány žádné příznaky lokální ani systémové infekce. Pomocí PCR a sekvenace však bylo prokázáno, že šťovík Uteuša je hostitelem těchto virů a mohl by v přírodě být zdrojem jejich infekce.

POUŽITÉ ZKRATKY

cDNA – complementary DNA

DNA – deoxyribonucleic acid

dNTP – deoxyribonucleotide triphosphate

MMLV – Moloney murine leukemia virus – reverzní transkriptáza

pb – base pair(s)

PCR – polymerase chain reaction

RaMV – Radish mosaic virus

RNA – ribonucleic acid

RT-PCR – reverse transcription PCR

ssRNA – single stranded RNA

TBE – pufr Tris-borát-EDTA

TYMV – Turnip yellow mosaic virus

POUŽITÁ LITERATURA

- Adams, M. J., Antoniw, J. F. (2006): DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. *Nucleic Acids Research* **34**, Database issue, D382-D385.
<http://www.dpvweb.net/>
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L. and Zurcher, E. J. (eds.) (1996 onwards): 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.'
URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- ICTVdB Management (2006a): 00.018.0.01.013. Radish mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- ICTVdB Management (2006b): 00.077.0.01.001. Turnip yellow mosaic virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Kára, J., Petříková, V. (2007): Krmný šťovík a jeho využití pro výrobu bioplynu. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=2059402>
- Petrzik, K., Holá, M., Špak, J. (2005): Complete nucleotide sequence of radish mosaic virus RNA polymerase gene and phylogenetic relationships in the genus *Comovirus*. *Acta virologica* **49**, 271 – 275.
- Petříková, V. (2002a): Porosty energetických rostlin v krajině. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=102849>
- Petříková, V. (2002b): Využití biomasy pro energii. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=104734>

- Petříková, V. (2003a): Krmný (energetický) šťovík není nebezpečný plevel. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=134531>
- Petříková, V. (2003b): Zkušenosti s pěstováním energetických rostlin v polních kulturách. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=155860>
- Petříková, V. (2003c): Nejnovější zkušenosti s pěstováním energetického šťovíku - Uteuša. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=158405>
- Petříková, V. (2005a): Energetická biomasa z polních kultur. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=235001>
- Petříková, V. (2005b): Biomasa z energetických rostlin. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=940486>
- Petříková, V. (2006): Energetické byliny a eroze. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=1913947>
- Petříková, V. (2007): Uplatnění krmného - energetického šťovíku. *Biom.cz*.
<http://biom.cz/index.shtml?x=2055331>
- Špak, J., Kubelková, D. (2000): Serological variability among European isolates of radish mosaic virus. *Plant Pathology* **49**, 295 – 301.
- Špak, J., Polák, J. (1988): Identifikace šesti izolátů náležejících třem sérologicky odlišným kmenům viru žluté mozaiky vodnice na brukvovitých plodinách v Československu. *Ochrana rostlin* **24**, 251 – 258.

Ušák, S. (2000a): Netradiční rostliny perspektivní pro bioenergetické účely. Energetické a průmyslové rostliny VI. Praha, CZ-Biom, 41 – 50.

Ušák, S. (2000b): Šťovík Uteuša – perspektivní energetická bylina. Energetické a průmyslové rostliny VI. Praha, CZ-Biom, 59 – 64.