

Metodika dlouhodobého hodnocení transgenní rezistence Biotech švestky, *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet' a netransgenní rezistence vybraných odrůd peckovin k viru šarky švestky.

Jaroslav Polák, Petr Komínek, Boris Krška, Jana Jarošová

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA



Pokusný sad Biotech švestky v roce 2017.

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

2018

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

Název: **Metodika dlouhodobého hodnocení transgenní rezistence Biotech švestky, *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet' a netransgenní rezistence vybraných odrůd peckovin k viru šarky švestky.**

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

Vyšlo v roce: 2018

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. Jitka Drozdová, PhD., odbor rostlinných komodit, Ministerstvo
zemědělství

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

Fotografie na úvodní straně: Polní výsadba geneticky modifikované švestky *Prunus domestica* L., klon C5 (cv. 'HoneySweet') v roce 2018.

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky a je výstupem řešení projektu NAZV QJ 1610186.

Metodice bylo uděleno osvědčení ÚKZÚZ 166507/2018.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Praha-Ruzyně, 2018

ISBN: 978-80-7427-274-5

I) Cíl metodiky

Úvod do problematiky.

Karantenní virus šarky švestky, *Plum pox virus* (PPV) byl zjištěn ve většině částí světa vyjma Austrálie, Nového Zélandu a Jižní Afriky. Způsobené ztráty na výnosech a kvalitě švestek a meruněk jsou odhadovány za posledních 30 let na 9000 milionů Euro (Cambra et al., 2006). V ČR je nejškodlivějším virem ovocných dřevin, který v 60. a 70. letech 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 meruňky, slivoně a broskvoně k PPV. Byla prokázána imunita odrůdy meruňky Harlayne k řadě izolátů a kmenů PPV a ve spolupráci se šlechtiteli meruněk a broskvoní (Prof. Ing. Boris Krška, PhD., Ing. Ivan Oukropec) otestovány desítky kříženců na rezistenci k PPV. Z některých kříženců vznikly nové odrůdy s vysokou rezistencí k PPV, např. odrůda meruňky 'Betinka'.

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.v.i. 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 komercializaci 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. V této certifikované metodice používáme název Biotech švestka, který je vhodný i s ohledem na situaci v Evropě.

Dosud neexistují kvalitní odrůdy švestky, rezistentní k šarce, které by mohly nahradit vysoce kvalitní, ale k PPV silně náchylnou odrůdu 'Domácí velkoplodá'. Klasické šlechtění na rezistenci je časově 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 velkoplodá' (ČR), 'Požegača' (Jugoslávie), 'Bystrická' (Rumunsko), 'Hauszwetske' (Německo). V posledních dvaceti letech se v zahraničí rozšiřuje využívání transgenní (GM), Biotech 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 Biotech odrůdy rostlin pěstují na více než 200 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, včetně odrůd zelenin a ovoce. V USA by nikdy nemohly být pěstovány odrůdy s jakýmkoli, byť minimálním rizikem pro zdraví obyvatel. V zbylé Evropě je to méně než 140tis. ha (0,08%), a to pouze GM/Biotech kukuřice, převážně ve Španělsku. V ČR to bylo i více než 5tis. ha, ale díky byrokratickým předpisům a překážkám bylo v ČR postupně pěstování Biotech kukuřice likvidováno. Získání, ověřování a pěstování odrůd rostlin s transgenní rezistencí eliminuje škody způsobované hospodářsky významnými patogeny a zejména používání pesticidů a 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 Biotech 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 Biotech švestky, klon C5 k PPV a dalším hospodářsky významným virům. První metodika zahrnovala 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. První metodika obsahovala i postup zjišťování rizika rekombinací mezi PPV-Rec a homologním transkriptem ve švestce 'HoneySweet', tehdy ještě klon C5.

První metodika hodnocení rezistence GM švestky byla vypracována na základě šestiletých výsledků hodnocení v roce 2009. 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 Biotech rostlin do rostlin r. *Prunus* vyskytujících se v okolí pokusu. V letech 2010-2014 byl řešen výzkumný projekt 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 zaměřeno i na hodnocení kvality plodů a porovnání s kvalitou plodů odrůd švestky 'Stanley' a 'Jojo' a dle požadavku Ministerstva životního prostředí na ověřování možnosti přenesení transgenu z rostlin GM do rostlin r. *Prunus* rostoucích v okolí pokusu. Na základě získaných výsledků tohoto výzkumu byla v roce 2014 vypracována a publikována 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*“. V roce 2013 došlo k silnému poškození sadu švestky 'HoneySweet' moniliovou infekcí a ovlivnění rezistence stromů k viru šarky švestky v dalších letech.

V letech 2016-2018 byl řešen výzkumný projekt NAZV „Přenos rezistence z GM odrůdy švestky 'HoneySweet' do odrůdy 'Domácí velkoplodá', hodnocení transgenní a netransgenní rezistence slivoní k viru šarky švestky.“ QJ 1610186, jehož výsledkem je i předkládaná „Metodika dlouhodobého hodnocení transgenní rezistence Biotech švestky, *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet' a netransgenní rezistence vybraných odrůd peckovin k viru šarky švestky.“ Metodika zahrnuje postupy šestnáctiletého hodnocení rezistence Biotech švestky 'HoneySweet' k viru šarky švestky v letech 2001-2018. její součástí je hodnocení příznaků PPV na listech a plodech pokusných stromů, hodnocení kvality plodů, sérologické hodnocení přítomnosti PPV, PDV a ACLSV pomocí DAS-ELISA, elektronmikroskopické stanovení částic PPV v listech Biotech švestky, stanovení relativní koncentrace PPV v listech pomocí semikvantitativní DAS-ELISA, stanovení PPV-Rec, PDV a ACLSV v listech pomocí molekulární metody RT-PCR, hodnocení přítomnosti PPV ve stromech Biotech švestky v podmínkách oslabení silnou moniliovou infekcí, a hodnocení možného přenosu transgenu do rostlin r. *Prunus*. Výsledky dlouhodobého hodnocení Biotech švestky prokazují skutečnost, že stromy 'HoneySweet' během několika let i přes silný a permanentní tlak PPV z rostoucích infikovaných roubů eliminují virus šarky švestky. Silné oslabení moniliovou infekcí vedlo k opětovné mírné infekci stromů, po které následovala opět eliminace viru. Vzhledem k tomu, že využití rezistence a pěstování Biotech švestky 'HoneySweet' je v evropských poměrech, resp. v EU v nedohlednu, zahájili jsme výzkum odrůd švestky a meruňky, u nichž byl prokázán určitý stupeň rezistence k PPV, založili jsme poloprovozní pokus s těmito odrůdami a v souladu s našimi originálními výsledky, kdy jsme prokázali nepřenosnost PPV mšicemi na dvě různé podnože (Polák a Komínek, 2014), zjišťujeme u třech vybraných odrůd slivoně a třech vybraných odrůd meruňky nepřenosnost PPV mšicemi.

Založení polní výsadby pro ověřování rezistence GM/Biotech švestky 'HoneySweet' k virům.

Zkoušení a pěstování genetiky modifikovaných 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/

Biotech švestky domácí s genem kapsidu viru šarky švestky v podmínkách trvalého vysokého tlaku inokula včetně směsných infekcí s dalšími hospodářsky významnými viry. Autor švestky 'HoneySweet' 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 Biotech švestka, klon C5. Jednoletí šlechtěnci Biotech švestky 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. získal 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. V roce 2017 došlo rozhodnutím MZP/2017/750/320 ze dne 28.11.2017 k dalšímu prodloužení do roku 2027.

Cíl pokusu a předkládané metodiky.

Cílem řešení a předkládané metodiky je dlouhodobý výzkum rezistence a vhodnosti pěstování Biotech švestky *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet' 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 Biotech švestky k infekci PPV a kombinacím s dalšími dvěma viry, ACLSV a PDV. Dalším cílem metodiky je výzkum netransgenní rezistence odrůd švestky a meruňky k viru šarky švestky. Cílem poloprovozního pokusu je ověřit možnou nepřenositelnost PPV na vybrané tři odrůdy slivoně a tři odrůdy meruňky s určitým stupněm rezistence k PPV. Předkládanou metodiku a dosažené výsledky využije Ovocnářská unie České republiky a ovocnářské podniky v ní sdružené k propagaci a využití podnože peckovin myrobalán PK, na kterou je virus šarky švestky mšicemi nepřenositelný. 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 k podání žádosti EFSA o uvolnění švestky 'HoneySweet' k pěstování a konzumaci plodů. Pokud bude prokázána nepřenositelnost PPV mšicemi na vybrané odrůdy švestky a meruňky, dojde v Ovocnářské unii a ovocnářské praxi k dalšímu využití výsledků tohoto výzkumu. Příslušné odrůdy pěstované na rezistentní podnoži myrobalán PK budou vysazovány v produkčních sadech. Tyto stromy a sady nebudou nikdy infikovány virem šarky švestky a ovocnářská praxe realizuje stamilionové přínosy.

II) Vlastní popis metodiky

Příprava transgenních/ Biotech rostlin švestky

K přípravě Biotech rostlin švestky domácí, *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet', dále jen GM/Biotech, s rezistencí k viru šarky švestky použijeme rouby a očka geneticky modifikovaných rostlin Biotech švestky 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. Během výzkumu jsme prokázali nepřenositelnost PPV mšicemi na podnož myrobalán PK (Polák a Komínek, 2014). Doporučujeme očkovat švestku 'HoneySweet' na viruprostou podnož myrobalán PK. Stromy zůstanou celou dobu životnosti šarky prosté.

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

Jednoleté šlechtěnce Biotech švestky pěstované v technickém izolátu inokulujeme v srpnu očkovaním jednotlivými viry, resp. očky pocházejícími ze zdrojů infekce, 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 vyztřelá očka zelených roubov 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 dlouhodobém 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.

Založení polní výsadby a uspořádání pokusu

Na jaře dalšího roku zkontrolujeme uchycení a rašení oček infikovaných PPV-Rec, ACLSV, PDV a kombinace PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV + PDV a založíme polní výsadbu pokusných stromů včetně zdravých kontrolních stromů (Obr. 1). Stromy

infikované v technické izolaci vysadíme v prostorové izolaci, jednotlivé kombinace 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 a údržba výsadby

Polní výsadbu rostlin švestky *P. domestica* L., cv. 'HoneySweet' s transgenní rezistencí k viru šarky švestky udržujeme v optimálním stavu, chráněnou před chorobami a škůdci. Ošetřování a údržbu výsadby řídil vedoucí autorského kolektivu. Výsadbu rostlin Biotech švestky 'HoneySweet', varianty infikované PPV-Rec, PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV, PPV-Rec + ACLSV + PDV, PDV, ACLSV a zdravé kontrolní stromy 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 zatrávněním, sekání travního porostu mezi řadami stromů po zatrávnění 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 roce 2013 však vlivem chladného a deštivého počasí došlo k silné moniliové infekci květů a výhonů všech pokusných stromů. Proto je v době trvalejších dešťů 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 Biotech švestky inokulované PPV-Rec, PDV, ACLSV, kombinacemi s ACLSV a PDV a zdravých kontrolních stromů.

Příznaky na listech stromů Biotech švestky cv. 'HoneySweet' hodnotíme v průběhu vegetační sezóny. Infikované i kontrolní stromy 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. 2) a listech v blízkosti 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 šestnáct vegetačních sezón 2003-2018. Na listech Biotech 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. Stromy infikované dalšími viry, zejména PDV však měly slabší růst. Nejméně rostoucí byly stromy infikované PPV-Rec + PDV + ACLSV.

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. 3), nebo nebyly zjištěny vůbec a v osmém roce byly jen na malém počtu listů několika stromů jednotlivých kombinací infikovaných PPV-Rec a s PDV a ACLSV. 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 přetrvávaly silné příznaky šarky (Obr. 4, 5) 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 poškozeny 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 v důsledku 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 dvakrát, v polovině července a v době dozrávání plodů v srpnu. Stromy Biotech švestky cv. 'HoneySweet' začaly plodit v nepříznivé

návětrné poloze ruzyňského letiště 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 (2011-2013) 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 v letech 2014 a 2015 prokázána, jak pomocí ELISA, tak molekulárním testem RT-PCR.

Hodnocení kvality plodů stromů Biotech švestky

Plody byly v souladu s rozhodnutím MŽP sklizeny před plnou zralostí. Plody byly sklizeny 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 prof. Krškovi 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. 6).

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 merunek 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).

Jeden až dva dny 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_Dmnožství kyselin obsažených ve vzorku (g)

V průběhu čtyř vegetačních cyklů byly hodnoceny základní vnitřní a vnější pomologické znaky všech variant po umělé inokulaci nejen PPV, ale i kombinacemi PPV s PDV a ACLSV. Bylo prokázáno, že infekce neměly významný vliv na hodnoty refraktometrické sušiny plodů (i když nejvyšší byla u kontrolní varianty, avšak ne statisticky významná), ani na celkový obsah titračních kyselin v plodech všech variant (s výjimkou varianty I, která byla infikována třemi viry, PPV, PDV a ACLSV, kde hodnota byla nejnižší, ne však průkazně). Rozdíly v pomologických vlastnostech byly větší u hmotnosti plodů pro varianty II a V (avšak neprůkazně), zatímco pro znaky šířka a tloušťka plodů byly nejnižší u varianty I a IV. Naopak největší výška plodů byla u varianty II, ale rovněž neprůkazně.

Subjektivně hodnocené vnitřní a externí pomologické znaky nebyly mezi variantami rozdílné, nebo neměly žádný komerční význam na dané hodnoty znaků. GMO slivoň 'HoneySweet' prokázala, že má vysokou míru rezistence nejen k PPV, ale také k dalším dvěma hospodářsky významným virům, PDV a ACLSV. Účinek umělých virových infekcí na kvalitu ovoce byl na minimální úrovni a ve většině případů nebyl statisticky významný. Kvalita plodů odrůdy 'HoneySweet' byla lepší nebo na podobné úrovni, než kvalita plodů odrůd „Stanley" a "Jojo", s výjimkou pevnosti dužniny. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v kvalitě plodů

sklizených z kontrolních stromů a ze stromů infikovaných PPV-Rec a kombinacemi s PDV a ACLSV.

Plody testovaných variant byly rovněž hodnoceny z hlediska antioxidační aktivity a to čtyřmi metodami (FRAP, DPPH, DMPD a ABTS). Nejvyšší hodnoty celkových polyfenolů byly zaznamenány v kontrolní variantě (65,3 mg / 100 g), následovně ve variantě po infekci PPV, dále pak ve variantě PPV, PDV a ACLSV, poté u varianty PPV a PDV a nejnižší hladiny byly naměřeny u varianty PPV a ACLSV (44,2 mg / 100 g), která měla nejnižší antioxidační aktivitu.

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.

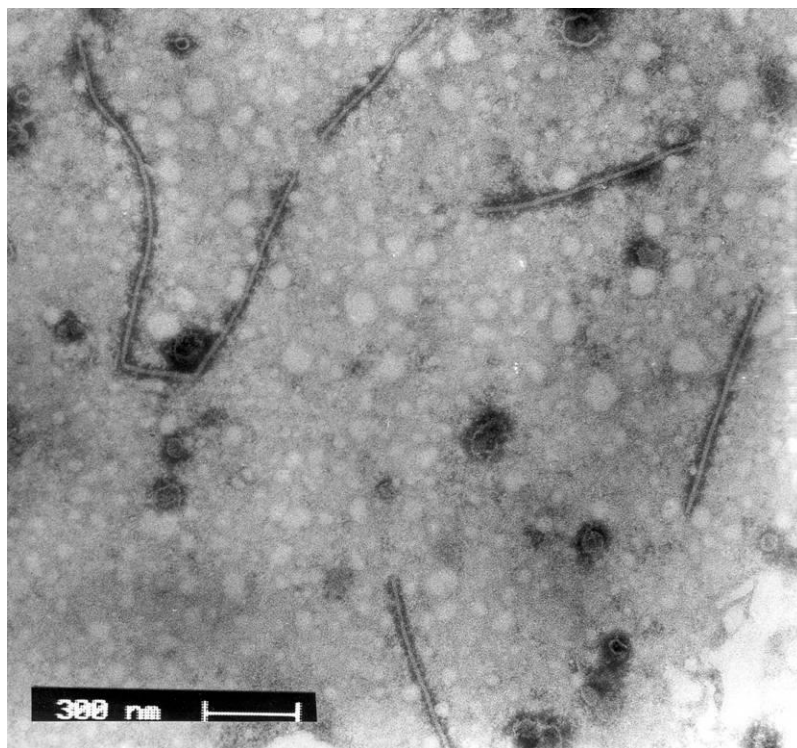
Příznaky na stromech Biotech švestky inokulovaných třemi kombinacemi virů byly hodnoceny po šestnáct vegetačních sezón 2003-2018, stejně tak jako stanovení virů PPV-Rec (rekvalif. PPV-M), ACLSV a PDV pomocí ELISA. Dosažené výsledky sérologického stanovení virů jsou prezentovány a diskutovány v části 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 Biotech rostlin cv. 'HoneySweet'. Pro stanovení přítomnosti vláknitých částic PPV je nejvhodnější použít metodu imunosorbční elektronové mikroskopie (ISEM).

Elektronmikroskopické síťky potáhneme formvarovou membránou (4% roztok formvaru v chloroformu). Síťky pouhlikujeme v pokovovacím přístroji za vysokého vakua. Potom síťky položíme pouhlikovanou stranou na kapku antiséra proti PPV zředěného 1:2000, resp. na hodnotu titru použitého antiséra po dobu 120 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 prohlédneme 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. 7). 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. 7. 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 Biotech švestky nacházeli jen ojediněle a díky tomu, že byly specifickými protilátkami z homogenátu adsorbovány.

Stanovení relativní koncentrace PPV v listech Biotech 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 pufovaného fosfátem na pH 7.2 s přidavkem 0.05% Tween 20, 0.2% polyvinylpyrrolidonu a 0.2% vaječného albuminu. Další ředění vzorků 1:2, 1:4, 1:8, atd. provedeme týmž puforem. 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 Biotech švestky *P. domestica*, cv. 'HoneySweet' byla ca padesátkrát nižší, než v listech z výhonů vyrostlých z PPV infikovaných oček (netransgenní část stromu). Relativní koncentrace PPV v listech 'HoneySweet' 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 Biotech švestky prokázat.

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

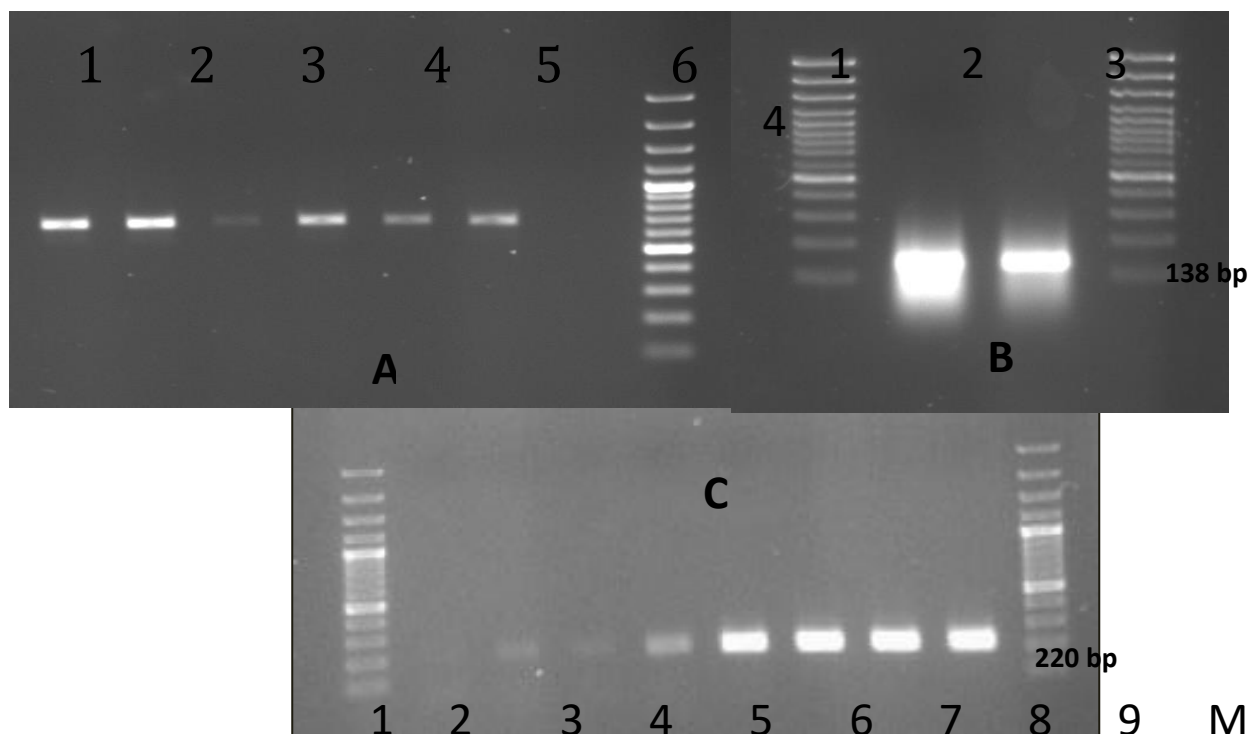
Ze stromů *P. domestica* L., klon C5, je nutno odebrat vzorky. Bylo odebíráno více náhodně vybraných listů, ze kterých byl utvořen směsný vzorek. Byly odebrány tři vzorky z každého stromu – infekční roub St. Julien (netransgenní část), spodní část transgenního stromu a vrchní část transgenního stromu. Vzorky byly nadrceny v tekutém dusíku a 100 mg bylo použito na extrakci RNA, nebo uchováno na -80 °C. Extrakce celkové RNA proběhla za pomoci kitu RNeasy Mini Plant (Qiagen, USA) s modifikacemi podle Mekuria et al. (2003).

Pro PCR detekci bylo využito kitu QIAGEN OneStep RT-PCR za použití 2 µl RNA a 55 °C teploty dosedání primerů. Jednotlivé primery pro jednotlivé viry jsou uvedeny v následující tabulce č.1.

Tabulka 1. Seznam primerů

Primer	Sekvence 5'-3'	T _m	Target
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

Vizualizace PCR produktů proběhla 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 bylo 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. 8).



Obr. 8. 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

Stanovení titru PPV-Rec v rostlinách Biotech švestky pomocí RT-qPCR

Ze stromů *P. domestica* L., klon C5, je nutno odebrat vzorky. Bylo odebíráno více náhodně vybraných listů, ze kterých byl utvořen směsný vzorek. Byly odebrány tři vzorky z každého stromu – infekční roub St. Julien (netransgenní část), spodní část transgenního stromu a vrchní část transgenního stromu. Vzorky byly nadrceny v tekutém dusíku a 100 mg bylo použito na extrakci RNA, nebo uchováno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extrakce celkové RNA proběhla za pomoci kitu RNeasy Mini Plant (Qiagen, USA) s modifikacemi podle Mekuria et al. (2003). Vzorky byly podrobeny ošetření DNázou I (DNAfree, Ambion).

18S ribozomální RNA byla použita jako endogenní kontrola pro relativní kvantifikaci. Primery Pru18SF1 5'-CGTCACACGCCGTTGCCCC-3' a Pru18SR1 5'-GAGCCGAGCATTTTTTCGAGCCC-3' amplifikovaly PCR fragment o velikosti 199 bp (NCBI Acc. Number EF211087) a primery specifické pro detekci PPV-Rec navržené v úseku (Cter) N1b-(Nter) CP 8532-8669 (NCBI Acc. Number AY028309) RecJF: 5'-AATGATATTGATGATAGCCTTGAC-3' and RecJR 5'-AGCTGGTTGAGTTGTTGCCAC-3' amplifikovaly produkt o velikosti 138 bp. Specifičnost primerů byla ověřena na kmenech PPV-D, PPV-M a PPV-Rec.

Pro absolutní kvantifikaci byl specifický fragment DNA vzniklý RT-PCR za použití výše zmíněných primerů RecJR a RecJF vložen do vektoru pGem-T (Promega Inc.) a naklonován do *E. coli* JM-109. Plazmid byl izolován, linearizován v oblasti Rsa I a použit pro in vitro transkripci za pomoci kitu Megascript T7 (Ambion Inc., TX) a následnému ošetření DNázou I (DNAfree, Ambion). Množství RNA bylo spektrofotometricky stanoveno a za pomoci rovnice: $\text{pmol of ssRNA} = \mu\text{g (of ssRNA)} \times (106 \text{ pg}/1\mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol}/340 \text{ pg}) \times (1/\text{Nb})$; kde Nb je počet bází transkriptu, a za pomoci Avogadrova čísla (6.023×10^{23} molecules/mol) byl vypočten počet kopií. Následně byly vytvořeny sériová ředění transkriptu a byly použity jako standardy pro kvantifikaci.

Pro RT-qPCR byl použit přístroj 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) a Power SYBR Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystem, USA) podle doporučeného použití. Hodnot relativní kvantifikace bylo dosaženo za pomoci výpočtů zahrnujících korekci účinnosti PCR pro jednotlivé geny (Pfaffl, 2001). Účinnost amplifikace byla stanovena za pomoci standardů a pohyboval se okolo 90%. Relativní exprese viru byla poté převedena na absolutní hodnoty.

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);

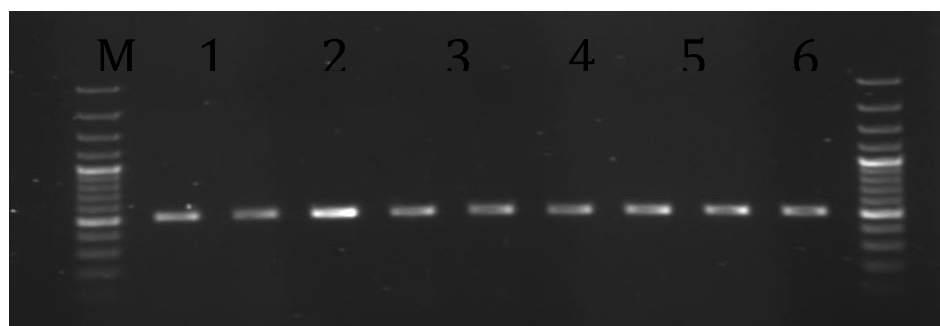
XIX) 35 cyklů ve třech krocích: 94°C po 20 s (denaturace), 60°C po 30 s (dosedání) a 72°C po dobu 1 min (polymerizace);

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. 9).



Obr. 9. 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 pomocí softwaru SEQCNCER (Gene Cods Corporation, USA). Sekvence pak porovnávají mezi sebou pomocí softwaru CLUSTAL_X (Thomson et al., 1997). Hodnocení variability sekvence se provádí 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 částí (podnož St. Julien) s PPV sekvence detekované z transgenních částí Biotech 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 domestica* L., cv. 'HoneySweet'.

Hodnocení možného přenosu transgenu do rostlin rodu *Prunus*.

Úvod.

Monitoring okolí místa pokusu s uváděním Biotech 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 nejbližší se vyskytují křížitelné příbuzné rostliny. Pokud bude vzhledem k terénním podmínkám uznáno za vhodné jej rozšířit, pak i dále. Budou vyhledávány jednoleté semenáčky planých stromů slivoně, myrobalánu a trnky a analyzovány průběžně během vegetačního období. Bude prováděn test na gen gus. Přítomnost transgenu bude rovněž kontrolována pomocí RT-PCR se 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 Biotech švestka, jednak výskyt případných semenáčků.

Kvetení

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

Testují se proto plody švestky Jojo a plody trnky. U švestky cv. Jojo, ačkoliv jsou vysazené v těsné blízkosti Biotech švestky, nebyl za 8 let monitoringu prokázán jediný přenos transgenu. Pravděpodobně proto, že rozkvétá o 4 dny později než Biotech švestka. V tu dobu jsou sice květy Biotech švestky ještě otevřené, ale pravděpodobně už v tu dobu jsou opylené a potenciální opylující hmyz nepřitahuje.

Jediným příbuzným a tedy i potenciálně křížitelným druhem, kvetoucím současně s Biotech slivoní v pokusu na letišti Ruzyně, je 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 transgenního potomstva u planých trnek blízka 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 trnky prováděné v minulých letech na pracovišti oddělení virologie VÚRV v.v.i. neprokázalo přenos transgenního pylu ani na tohoto hostitele.

U myrobalánů a trnky 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 nenavštívuje 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 Biotech slivoní kvetly ve stejnou dobu jiné odrůdy slivoní. Podle výsledků nedávno publikovaných autory Biotech 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 Biotech semenáčů, protože je známo, že pecky švestky „málokdy rostou“ (Anonym, 1936).

Výskyt semenáčů

Výskyt případných semenáčů sledujeme během celého roku v okolí rostlin rodu *Prunus*, tedy myrobalánu, trnky a švestky. 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 Biotech švestky jako pozitivní kontrolu a mladé listy švestek pěstovaných mimo oblast s Biotech švestkami jako negativní kontrolu.

Po naplnění mikrotitračních 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. 10, 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, Biotech švestku.

2. Monitoring přenosu pylu na kompatibilní rostliny

Detekce *gus* genu v plodech stromů švestky a trnky.

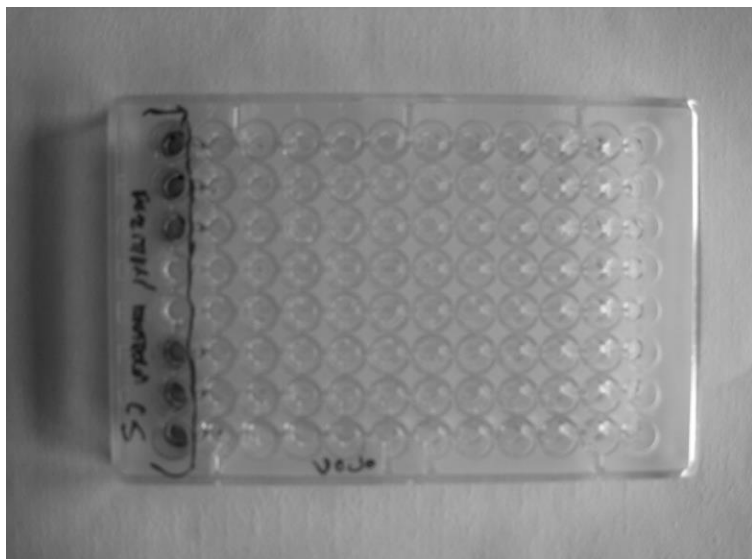
Plody švestky, případně trnky, nasbíráme v době před úplnou zralostí, abychom minimalizovali opad plodů. Sklízíme zvlášť pecky ze švestek odrůdy Jojo a zvlášť z Biotech švestky. Tyto švestky zrají většinou v průběhu měsíce srpna, Biotech švestky dříve než odrůda Jojo. Koncem října sklízíme trnky z okolí pokusu s Biotech švestkou cv. 'HoneySweet'. 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 z pecek švestek pěstovaných mimo oblast s Biotech švestkami jako negativní kontrolu. Pokud nemáme k dispozici embrya z Biotech švestky, použijeme malý kousek mladšího listu testovaného stromu.

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. 11, 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 Biotech švestkou.



Obr. 11. Detekce markerového genu *gus* v embryích semen švestky pomocí biochemického barvení, mikrotitrační deska.

Sloupec desky číslo 1 - zcela vlevo, ohraničený černou barvou: embrya z pecek
Vysvětlivky: Biotech švestky cv. 'HoneySweet' 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 Biotech stromů švestky. 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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,76g na 200 ml vody)
- přidáme 0,042 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
- přidáme 0,200 ml Triton X-100
- mícháme 10 minut, upravíme $\text{pH} = 7.0$
- 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

Hodnocení netransgenní rezistence vybraných odrůd švestky a meruňky, nepřenositelnosti viru šarky švestky mšicemi.

V ovocnářském podniku Ostroměř byl dle metodických pokynů odpovědného autora metodiky založen poloprovozní pokus na ověřování nepřenositelnosti viru šarky švestky mšicemi na vybrané klasické, netransgenní odrůdy slivoně, rezistentní k PPV, konkrétně 'Anna Späth', 'Gabrovská' a 'Althanova renkloda'. Navíc oproti metodice řešení výzkumného projektu byly obdobně vysazeny tři odrůdy meruňky se stejnými vlastnostmi jako odrůdy slivoně. Všechny vysazené odrůdy jsou pěstovány na podnoži myrobalánu PK, na niž je PPV mšicemi nepřenositelný. Mezi stromy uvedených odrůd byly vysazeny ve vzdálenosti 2 až 2,5 metru stromy švestky, odrůda 'Domácí velkoplodá', která je k PPV silně náchylná. Tyto stromy byly ve VŠÚO Holovousy infikovány PPV očkováním infikovaných roubů. Stromy švestky 'Domácí velkoplodá' slouží jako zdroj přirozené infekce PPV. Dále byly v obdobné vzdálenosti od stromů testovaných odrůd švestky a meruňky vysazeny zdravé stromy švestky 'Domácí velkoplodá', které slouží jako pozitivní kontrola. Měly by být postupně infikovány virem šarky švestky přirozenou infekcí mšicemi. Poloprovozní pokus byl založen v roce 2016 ovocnářským podnikem Kareš, Ostroměř ve spolupráci s prvním autorem této metodiky a pracovníky VŠÚO Holovousy, kteří inokulovali stromy švestky 'Domácí velkoplodá' PPV a ověřili v nich přítomnost viru. V sadu probíhá každoročně počínaje rokem 2017 hodnocení stromů a testovaných odrůd. Doc. Polák hodnotí výskyt případných příznaků na listech a v případě zjištěných příznaků i objektivní přítomnost PPV pomocí imunoenzymatického testu ELISA. Pracovníci VŠÚO Holovousy testují všechny stromy na přítomnost PPV pomocí ELISA a RT-PCR.

Celkové vyhodnocení, výsledky a závěry získané z polního pokusu výzkumu rezistence Biotech švestky *P. domestica* L., cv. 'HoneySweet' k PPV, PDV a ACLSV a z výzkumu rezistence netransgenních odrůd peckovin k přenosu PPV mšicemi.

Dlouholetým hodnocením pokusného sadu Biotech švestky cv. 'HoneySweet' byly získány významné a komplexní výsledky. Bylo prokázáno, že během dlouholetého hodnocení může dojít k silnému oslabení stromů, konkrétně silnou moniliovou infekcí, po které následovalo oslabení rezistence k viru šarky švestky, a během dalších třech let k opětovné eliminaci PPV v uměle infikovaných stromech, a to přes stálý a silný infekční tlak jednotlivými viry. Stromy pokusného sadu byly inokulovány rouby infikovanými PPV a kombinacemi s PDV a ACLSV. 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 přetrvávaly silné příznaky šarky a byla v nich přítomna vysoká koncentrace viru. V listech některých stromů již nebylo možno PPV prokázat a tyto stromy byly v letech 2007-2010 bez jakýchkoli příznaků šarky. V letech 2011-2013 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. V roce 2013 došlo k silné moniliové infekci stromů a jejich vážnému oslabení. V letech 2014-2016 došlo k oslabení rezistence stromů vůči PPV a postupně opět k eliminaci viru tak, že v letech 2017 a 2018 byly stromy opět bez jakýchkoli příznaků šarky a výsledky stanovení PPV pomocí ELISA v listech i plodech stromů byly negativní.

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 klesala v listech stromů se směsnými infekcemi obdobně, jako ve stromech infikovaných pouze PPV-Rec. Další dva viry nezpůsobovaly 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. Velmi mírné příznaky PPV na malém počtu plodů Biotech 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 Biotech švestky cv. 'HoneySweet' na žádné rostliny rodu *Prunus* v okolí pokusu.

V roce 2016 byl založen a je hodnocen poloprovozní pokus se třemi netransgenními odrůdami švestky a třemi odrůdami meruňky, u nichž je zjišťována nepřenosnost viru šarky mšicemi za přirozeného infekčního tlaku. V letech 2017 a 2018 nebyly zjištěny žádné příznaky infekce. V roce 2018 bylo zjištěno několik pozitivních reakcí pomocí ELISA a RT-PCR, které bude nutno potvrdit v dalších letech a zjistit, zda se objeví příznaky PPV na listech testovaných stromů.

Výsledky výzkumu dosažené při řešení projektu byly publikovány v impaktovaných a recenzovaných vědeckých časopisech, viz seznamy publikací. Probíhající pokus potvrdil vysokou rezistenci Biotech 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' virem šarky švestky 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 PK, 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. Pokud bude prokázána nepřenosnost

PPV mšicemi na některé zkoušené netransgenní odrůdy švestky a meruňky, budou okamžitě využity v ovocnářské praxi v kombinaci s podnoží mající stejnou vlastnost. Stromy a sady těchto odrůd nebudou po celou dobu životnosti infikovány virem šarky švestky.

III) Srovnání novosti postupů.

„Metodika dlouhodobého hodnocení rezistence Biotech švestky, *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet' a netransgenních odrůd švestky a meruňky k viru šarky švestky“ obsahuje komplexní a nový postup hodnocení geneticky modifikované trvalé ovocné kultury v České republice, i hodnocení netransgenních odrůd peckovin, 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. V České republice dosud žádná jiná geneticky modifikovaná trvalá ovocná kultura hodnocena nebyla. Navazuje na „Komplexní hodnocení rezistence GM švestky, *Prunus domestica* L., klon C5 k viru šarky švestky, kvality plodů“, kde byl vypracován postup hodnocení rezistence geneticky modifikované slivoně transformované s obalovým proteinem genu PPV. Postup zahrnuje hodnocení listů a plodů včetně hodnocení kvality plodů a srovnání této kvality s pěstovanými kontrolními odrůdami. Postup hodnocení obsahuje 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. Součástí dlouholetého hodnocení rezistence prezentovaného v této metodice je i hodnocení silného přirozeného napadení stromů houbou *Monilia* sp. s následným oslabením rezistence k viru šarky švestky a opětnou postupnou eliminací PPV v pokusných stromech. Zcela nový je i metodický postup hodnocení stromů pomocí kvantitativní RT-PCR a využití této metody. Nové je i hodnocení několika netransgenních odrůd švestky a meruňky na nepřenositelnost PPV mšicemi. Několik použitých nezávislých metod a postupů hodnocení rezistence zaručuje maximální spolehlivost výsledků. Prezentované metodické postupy je možno použít i pro hodnocení dalších geneticky modifikovaných odrůd i netransgenních 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 ovocnářské podniky, tedy pro ovocnářskou zemědělskou praxi a dále pro 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 Biotech švestky *Prunus domestica* L., cv. 'HoneySweet', registrované a uvolněné do životního prostředí v USA, i při využití netransgenních odrůd švestky a meruňky, na něž je virus šarky švestky nepřenositelný mšicemi pro pěstování v České republice. Bude využita v rozhodovacích procesech pro uvolnění cv. HoneySweet do životního prostředí v Evropské unii a České republice a následně bude uplatněna ovocnáři při pěstování této odrůdy švestky rezistentní k viru šarky švestky v České republice.

V) Ekonomické aspekty

Metodika dlouhodobého hodnocení rezistence Biotech švestky 'HoneySweet' k viru šarky švestky (PPV) a hodnocení vybraných netransgenních odrůd švestky a meruňky na nepřenositelnost PPV mšicemi přináší z hlediska ochrany peckovin, jmenovitě slivoní a pravých švestek i merunek 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 Biotech švestku 'HoneySweet' mšicemi nepřenositelný, což bylo prokázáno a publikováno v zahraničí a potvrzeno během šestnácti let 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 nepřenositelný, zůstanou nově vysazené stromy a sady prosté šarky po celou dobu jejich existence. Takové podnože jsme objevili, nepřenositelnost 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, nehledě na mnohem vyšší kvalitu plodů. Znetvořené plody z takových sadů jsou pro velmi špatnou kvalitu mnohdy nepoživatelné a 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 72.520,- Kč/ha. Pokud by v ČR bylo vysazeno pouze 100 ha rezistentní švestky, tj. 5 % současné výměry, bude průměrný roční přínos ca 7.258.000,- Kč, a za 20 let trvání sadu až 145 milionů Kč. Návratnost nákladů na tento dlouhodobý výzkum bude zajištěna během několika málo let. Celkový finanční přínos pak dosáhne ca 145 milionů Kč minus náklady na výzkum. Přitom kalkulujeme pouze 5 % obměnu z celkové výměry stromů švestky 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 i využití netransgenních odrůd švestky a meruňky, na něž je PPV nepřenositelný mšicemi budou pokračovat, pak by v budoucnu mohlo dojít k nahrazení většiny, nebo celé pěstební výměry odrůd slivoně a meruňky, 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. Všechny dosažené výsledky byly také publikovány v řadě původních vědeckých sdělení, viz seznam literatury.

Poděkování: Odpovědný řešitel výzkumného projektu a předkládané metodiky za VÚRV v.v.i. Praha Doc. Ing. Jaroslav Polák, DrSc. se spoluautory v první řadě děkuje velmi fundovaným pracovníkům, paní Jitce Pívalové a Ing. Marcelle Komínkové za stanovení virů pomocí ELISA a relativní koncentrace PPV pomocí semikvantitativní ELISA, paní Miloslavě Ducháčové za stanovení intaktních částic PPV pomocí imunisorbční elektronové mikroskopie. Kolektiv autorů metodiky vyslovuje poděkování za spolupráci Ing. Jibanu Kumarovi, PhD., dále Ing. Evě Svobodové a Ing. Tereze Neubauerové, PhD. za molekulární diagnostiku virů podle dříve vypracované metodiky, Ing. Jiřímu Svobodovi, PhD. za očkování dosadby Biotech švestky viry PDV a ACLSV a pánům Petru Smutnému a Milanu Jokešovi za celoroční udržování a agrotechniku unikátní pokusné výsadby Biotech švestky. Ing. F. Papršteinovi, CSc. a ing. J. Sedlákov, PhD. z VŠÚO Holovousy za hodnocení netransgenní rezistence vybraných odrůd švestky a meruňky a ing. P. Karešovi, ovocnářský podnik Ostroměř za založení a udržování poloprodučního pokusu. Paní Miloslavě Ducháčové děkujeme 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.

Cambra M., Capote N., Myrta A., Llácer G., 2006. Plum pox virus and the estimates costs associated with sharka disease. Bull. OEPP/EPPO Bul. 36: 202-204.

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 transgenic 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 of 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 dwarf virus* (PDV), and *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) with transgenic plants of plum *Prunus domestica*, clone C-5 grown in an 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.

Polák J., Kumar J., Krška B., Ravelonandro M. 2012. Biotech/GM crops in horticulture: plum cv. HoneySweet resistant to *Plum pox virus*. *Plant Protect. Sci.* 48: S43-S48.

Polák J., Jarošová J., Kumar J., Krška B., Gogolková G., Kizek R., Scorza R., Ravelonandro M. 2013. The evaluation of virus symptoms and fruit quality of GMO, PPV-resistant *P. domestica* 'HoneySweet' grown in the open field under a high and permanent infection pressure of PPV, ACLSV, and PDV. *Acta Horticulturae* 974: 65-70.

Polák J., Komínek P. 2014. Evaluation of rootstocks of stone fruits for resistance to natural *Plum pox virus* infection. *Can. J. Plant Pathol.* 36: 116-120.

Polák J., Kumar J., Krška B., Beoni E., Komínek P., Pívalová J., Jarošová J. 2017. Transgenic plum *Prunus domestica* L., clone C5 (cv. HoneySweet) for protection against sharka disease. *J. Integrative Agriculture* 16: 516-522.

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.

Sochor J., Krška B., Polák J., Juriková T. 2015. The influence of virus infections on antioxidant levels in the GM plum variety HoneySweet (*Prunus domestica* L.). *Potravinářstvo* 9: 195-200.

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 for multiple 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 Recombinations 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 virus*. *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 resistance to plant viruses in the Czech republic. *Petria* 22: 381-387.

Polák J., Jarošová J., Kumar J., Krška B., Gogolková G., Kizek R., Scorza R., Ravelonandro M. 2013. The evaluation of virus symptoms and fruit quality of GMO, PPV-resistant *P. domestica*

'HoneySweet' grown in the open field under a high and permanent infection pressure of PPV, ACLSV, and PDV. *Acta Horticulturae* 974: 65-70.

Polák J., Komínek P. 2014. Evaluation of rootstocks of stone fruits for resistance to natural *Plum pox virus* infection. *Can. J. Plant Pathol.* 36: 116-120.

Polák J., Kumar J., Krška B., Beoni E., Komínek P., Pívalová J., Jarošová J. 2017. Transgenic plum *Prunus domestica* L., clone C5 (cv. HoneySweet) for protection against sharka disease. *J. Integrative Agriculture* 16: 516-522.

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. Mírné difuzní skvrny způsobené PPV na listu cv. 'HoneySweet' druhý rok po inokulaci.



Obr. 3. Velmi mírné 2 difuzní skvrny na listu cv. 'HoneySweet' pátý rok po inokulaci.



Obr. 4. Silné žluté skvrny a kroužky na listu zdroje infekce, 2. rok po inokulaci PPV.



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



Obr. 6. Porovnání plodů švestky odrůdy 'Jojo' (horní řada) a Biotech švestky cv. 'HoneySweet' (dolní řada).



Obr. 10. 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 Biotech švestky cv. 'HoneySweet' jako pozitivní kontrola, tedy obsahující gen *gus*.

Jsou zbarveny modře.