

METODY IZOLACE DNA Z ČERSTVÉ DŘEVNÍ HMOTY PRO ÚČELY MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY V OVOCNÁŘSTVÍ

METHODS OF DNA ISOLATION FROM FRESH WOOD FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS IN FRUIT GROWING

Martina Rejlová, Lucie Valentová, Radek Čmejla

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.,
Holovousy 129, 508 01

e-mail: Martina.REJLOVA@vsuo.cz, ORCID: [0000-0002-6687-8508](https://orcid.org/0000-0002-6687-8508)

ABSTRAKT

DNA byla izolována z čerstvých dřevních pletiv kmene meruňky (*Prunus armeniaca* L.) pomocí tří různých komerčních kitů (výrobci GeneAll, Zymo Research, Wizbiosolutions) a dvou metod mechanické homogenizace hoblin (tekutý dusík a třecí miska s tloučkem vs. kuličkový homogenizátor). Cílem této studie bylo zlepšit výtěžnost a kvalitu extrahované DNA ze dřeva ovocného stromu pro následné molekulárně-biologické analýzy. Zaměřili jsme se na dva klíčové faktory ovlivňující kvalitu izolované DNA ze dřeva: (i) vliv průměru vrtáků na velikost a množství hoblin a jejich vhodnost pro následné zpracování, a (ii) porovnání metod mechanické homogenizace vzorku a izolačních protokolů z hlediska míry fragmentace DNA. Nejnižší hodnoty Ct (real-time PCR pro chloroplastový gen) a vysoká reprodukovatelnost byly dosaženy při použití vrtáku o průměru 1,5 mm, zatímco vrták o průměru 4 mm se osvědčil jako nejefektivnější pro rychlý odběr materiálu. Homogenizace v tekutém dusíku vedla u kitů od GeneAll a Wizbiosolutions k vyšší výtěžnosti DNA než pomocí kuličkového homogenizátoru, zatímco u kitu od Zymo Research byla účinnější kuličková homogenizace. Amplifikace chloroplastových genů *rbcL* (599 bp) a *matK* (1292 bp) i rDNA oblasti (konkrétně ITS) specifické pro houby (210–230 bp), potvrdila rozdíly v kvalitě DNA mezi jednotlivými kombinacemi protokolů. Nejdelší fragment *matK* byl úspěšně amplifikován u všech vzorků pouze u DNA izolované pomocí kitu od Wizbiosolutions. Celkově nejlepších výsledků z hlediska výtěžnosti, čistoty a amplifikovatelnosti DNA bylo dosaženo při použití kitu od Wizbiosolutions.

Klíčová slova: dřevo, *Prunus*, izolace DNA, PCR

ABSTRACT

DNA was isolated from fresh wood tissue of apricot tree trunks (*Prunus armeniaca* L.) using three different commercial kits (manufacturers GeneAll, Zymo Research, Wizbiosolutions) and two methods of mechanical homogenization of wood chips (liquid nitrogen and mortar and pestle vs. ball mill). The aim of this study was to improve the yield and quality of DNA extracted from woody tissue of fruit tree for subsequent molecular biological analyses. We focused on two key factors affecting the quality of DNA isolated from wood: (i) the effect of drill bit diameter on the size and quantity of wood chips and their suitability for subsequent processing, and (ii) a comparison of mechanical homogenization techniques and DNA extraction protocols in terms of DNA fragmentation. The lowest Ct values (real-time PCR targeting a chloroplast

gene) and highest reproducibility were achieved using a 1.5 mm diameter drill bit, while a 4 mm diameter drill bit proved to be the most effective for rapid material collection. Homogenization in liquid nitrogen resulted in higher DNA yields for the GeneAll and Wizbiosolutions kits compared to ball mill homogenization, whereas the Zymo Research kit performed better with ball mill homogenization. Amplification of chloroplast genes *rbcL* (599 bp) and *matK* (1292 bp) as well as the fungal-specific rDNA region (specifically the ITS region) (210–230 bp) confirmed differences in DNA quality between individual protocol combinations. The longest fragment (*matK*) was successfully amplified in all samples only when DNA was extracted using the Wizbiosolutions kit. Overall, the best results in terms of DNA yield, purity, and amplifiability were obtained with the Wizbiosolutions kit.

Keywords: wood, *Prunus*, extraction DNA, PCR

ÚVOD

Získání DNA z dřevních pletiv v dostatečné kvalitě představuje klíčový předpoklad jak pro spolehlivou detekci patogenů, tak pro využití DNA barcodingu v analýze tohoto rostlinného materiálu. Zatímco izolace DNA z čerstvých rostlinných pletiv, například z listů, pupenů či lýka, je dnes rutinním laboratorním postupem, ze dřeva je tento proces složitější, zejména u jádrového dřeva (Lowe a Cross 2011). V dřevních pletivech je DNA přítomna pouze v malém množství. V bělovém a přechodovém dřevě DNA obsahují živé parenchymatické buňky, zatímco v jádrovém dřevě, kde jsou buňky odumřelé, dochází k degradaci organel a jader buněk a k postupné fragmentaci DNA. Účinnou izolaci dále komplikují třísloviny, pryskyřice, gumy, silice a barviva, které se hromadí zejména v jádrovém dřevě (Deguilloux *et al.* 2002, Rachmayanti *et al.* 2009, Jiao *et al.* 2020).

Přehledová studie z roku 2020 shrnuje celosvětový vývoj a budoucí směřování DNA barcodingu při identifikaci dřeva (Jiao *et al.* 2020). Uvádí, že v posledním desetiletí došlo k optimalizaci metod izolace DNA z čerstvého nebo technicky zpracovaného dřeva, případně starého dřeva (archeologické nálezy) pro účely DNA barcodingu, který představuje efektivní nástroj pro identifikaci dřeva na úrovni druhu. Metoda je v praxi aplikovatelná k několika účelům, včetně kontroly obchodu se dřevem (odhalení falešně deklarovaných produktů), ochranu lesních zdrojů (zejména ohrožených druhů dřevin), taxonomické, ekologické a forenzní identifikace (např. při posuzování případů nelegální těžby) či výzkumu zaměřeného na monitoring diverzity dřevin. Práce je však zaměřena na průmyslově využívané lesní dřevo, ovocné dřeviny do ní nebyly zahrnuty.

Izolace DNA z dřevních pletiv rostoucích ovocných stromů je významná z pohledu detekce přítomných patogenních mikroorganismů, zejména dřevokazných hub a bakterií kolonizujících xylém. Dosud bylo popsáno jen velmi málo metod mikrobiální extrakce DNA přímo z čerstvého dřeva jako vstupního materiálu (Yu *et al.* 2022). Existuje například studie (Bruez *et al.* 2015) zaměřená na charakterizaci bakteriálního mikrobiomu ve dřevních pletivech révy vinné zasažených houbovým onemocněním Esca, přičemž byla analyzována jak symptomatická, tak asymptomatická dřevní pletiva. Připravená dřevní štěpka byla rozemleta v kryogenním kulovém mlýnu a DNA byla izolována pomocí Indvisorb Spin Plant mini Kit (Invitek) dle návodu výrobce. Další práce se zabývala onemocněním kmene stromu způsobeným dřevokaznými houbami u peckovin (Fungal Trunk Disease, FTD) a k identifikaci přítomných houbových patogenů využila DNA izolovanou z čistých kultur, přičemž štěpky z infikovaného dřeva byly asepticky kultivovány na živném médiu (Spetik *et al.* 2024). Tento přístup umožňuje podrobnou charakterizaci převažujících druhů v infikovaném pletivu, jeho nevýhodou je však

časová náročnost diagnostického procesu. Naproti tomu izolace DNA přímo z čerstvého dřeva nabízí potenciál pro rychlejší a přesnější detekci patogenů, avšak vyžaduje optimalizaci homogenizačního a izolačního protokolu s ohledem na konkrétní druhy dřevin. Aktuálně publikovaná práce od Navrátila *et al.* (2025) představuje studii zaměřenou na houbový mikrobiom meruněk. Pomocí metagenomické analýzy založené na sekvenaci ITS1 a ITS2 (Internal Transcribed Spacer 1 a 2) oblastí rDNA autoři zkoumali, jak se liší složení houbových společenstev ve větvích stromů odumírajících meruněk. Jako vstupní materiál byly použity segmenty větví obsahující lýkové a dřevní pletivo. Po lyofilizaci byly vzorky mechanicky homogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru a DNA byla izolována s využitím kitu Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.).

Naše studie se zaměřuje na identifikaci klíčových faktorů ovlivňujících kvalitu izolované DNA z ovocných stromů, a to konkrétně z dřevního pletiva meruňky (bez lýka), které může být kolonizováno patogenními houbami a bakteriemi. Tyto mikroorganismy mohou způsobovat nekrózy, ucpávání vodivých pletiv a postupný rozvoj symptomů chřadnutí, což významně přispívá k odumírání stromů. Cílem je přispět k optimalizaci a rozvoji modifikovaných izolačních protokolů, které budou efektivně využitelné nejen v oblasti molekulární diagnostiky patogenů, ale také v taxonomických aplikacích, jako je DNA barcoding, a v nástrojích ochrany rostlinné biodiverzity.

MATERIÁL A METODY

Příprava vzorků

Dřevní hmota (xylém) byla získána z náhodně vybraného stromu meruňky ze šlechtitelské výsadby společnosti VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o. Kříženeček byl vysazen na podzim roku 2018 na podnoži St. Julien A. Strom vykazoval příznaky svinování a usychání listů, v přízemní části kmene byla přítomna léze o velikosti 10 cm (Obrázek 1). Na základě pozorovaných symptomů byl strom vyšetřen na přítomnost fytoplazmy ze skupiny 16 SrX, přičemž analýza potvrdila jednoznačně pozitivní nález. Strom byl dne 17. 7. 2025 pokácen. Kmen byl rozdělen na pět segmentů o délce 10 až 15 cm, čímž vznikly řezné plochy vhodné pro následný odběr hoblin. Dřevní válce byly do doby zpracování uloženy do chladicího boxu. Hobliny byly připraveny pomocí elektrické vrtačky. Použité vrtáky různých průměrů (1,5; 2; 3; 4; 5 a 6 mm) byly před každým použitím dezinfikovány. V rámci experimentu byly testovány dva přístupy k homogenizaci hoblin – v kapalném dusíku za použití třecí misky s tloučkem, a v přítomnosti lyzačního pufru pomocí lineárního homogenizátoru (TissueLyser II, Qiagen) se zkumavkami obsahujícími drtící keramické kuličky (ZR BashingBead™ Lysis Tube 2,0 mm, Zymo Research) při maximální frekvenci 30 Hz po dobu 5 minut. Připravený homogenát byl okamžitě podroben extrakci DNA.

Izolace DNA

Pro získání kvalitní genomové DNA ze dřeva meruňky byly zvoleny pro srovnání tři komerční extrakční DNA kity:

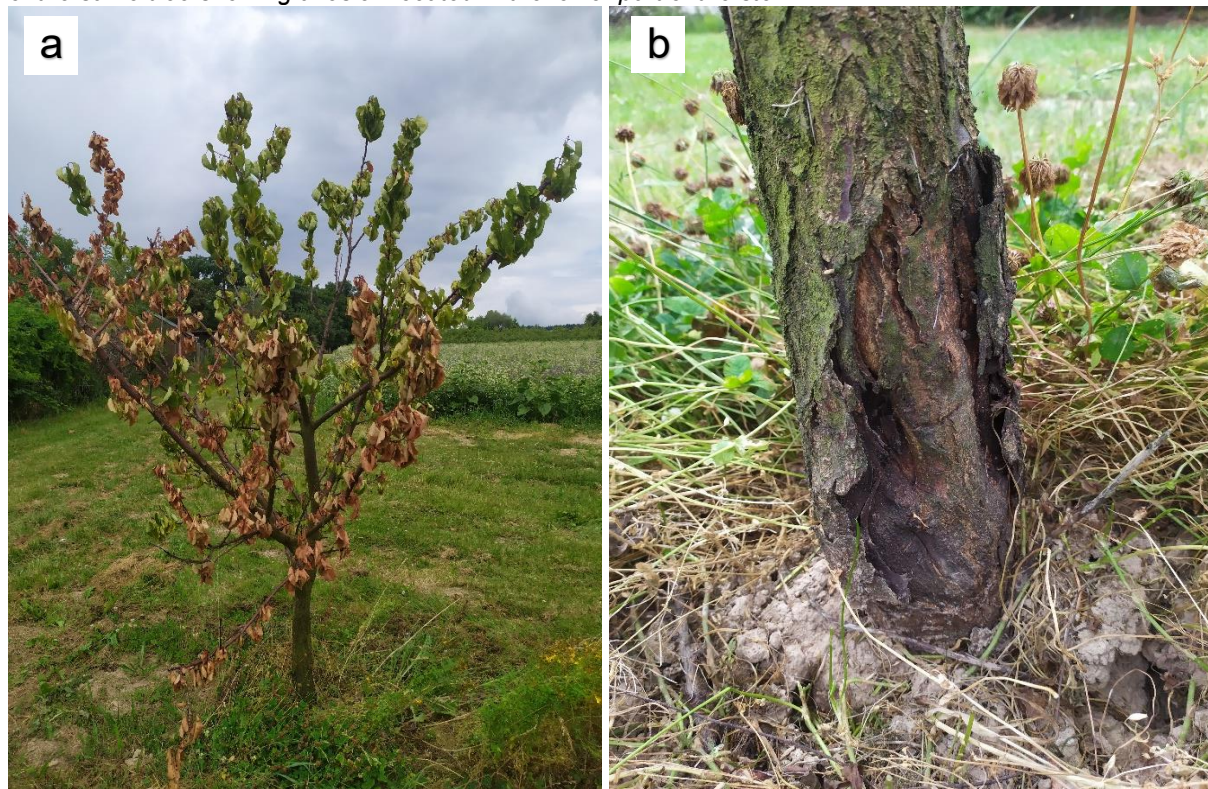
1. **Exgene™ Plant SV mini** (GeneAll) - izolace DNA byla provedena podle protokolu dostupného na webových stránkách výrobce (GeneAll Biotechnology 2025).
2. **Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep Kit** (Zymo Research) - kit disponuje zkumavkami s keramickými kuličkami (ZR BashingBead™ Lysis Tube 2,0 mm) pro homogenizaci pomocí kuličkového homogenizátoru, zároveň obsahuje kolonu pro odstranění PCR inhibitorů (polysacharidů a polyfenolů/taninů). Postup je popsán v protokolu výrobce (Zymo Research Corporation 2025).

3. **WizPrep™ Plant DNA Mini Kit** (Wizbiosolutions) - DNA byla izolována podle oficiálního protokolu výrobce (Wizbiosolutions 2025)

Standardní navážka byla 100 mg čerstvých hoblin. Izolovaná DNA byla následně eluována do 100 μ l příslušného elučního pufru. Z důvodu přehlednosti budou jednotlivé izolační kity dále označovány zkratkami GA (GeneAll), ZR (Zymo Research) a WS (Wizbiosolutions). Testování jednotlivých přístupů bylo děláno vždy paralelně ze stejného vstupního materiálu.

Obrázek 1. a) Odumírající strom meruňky vybraný pro izolaci DNA z čerstvých dřevních pletiv, b) detail kmene téhož stromu s lézí v dolní části kmene

Figure 1. a) Decline of apricot tree selected for DNA extraction from fresh wood tissue, b) detail of the trunk of the same tree showing a lesion located in the lower part of the stem



Hodnocení množství a kvality DNA

Pro stanovení koncentrace izolované DNA v eluátu byl použit fluorometr Qubit (Thermo Fisher Scientific) s využitím Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Amplifikace DNA a identifikace

Interní kontrola kvality izolace DNA byla ověřena detekcí přítomnosti chloroplastové 16S rDNA pomocí real-time PCR. Pro vlastní real-time PCR detekci byly použity následující reagenty: qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) dle návodu výrobce, navržené specifické primery a sondy pro chloroplastovou DNA (délka úseku 147 bp), 2 μ l DNA bez úpravy koncentrací. Detekce byla realizována pomocí real-time termocykleru RotorGene Q (Qiagen). Počáteční denaturace byla prováděna po dobu 5 minut při teplotě 94 °C. Následně byla provedena tříkroková amplifikace s 50 cykly, a to denaturace při 94 °C po dobu 20 sekund, hybridizace primerů při teplotě 58 °C po dobu 20 sekund, syntéza komplementárních vláken DNA při teplotě 72 °C v délce trvání 20 sekund. Amplifikační data byla zpracována v Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen).

K posouzení kvality (míry fragmentace) DNA izolované z dřevních pletiv byly použity PCR primery specifické pro vybrané oblasti chloroplastového genomu, cílené na konzervované geny *rbcL* a *matK*, které představují standardizované markery využívané pro molekulární identifikaci rostlin (CBOL Plant Working Group 1 *et al.* 2009). Očekávané délky amplikonů činily 599 bp (*rbcL*) a 1292 bp (*matK*). Primery pro *rbcL* oblast byly převzaty z literatury (Kress *et al.* 2009). Pro oblast *matK* byl reverzní primer původně převzat z databáze BOLD od autora Masha L. Kuzmina (© BOLD Systems 2025), zatímco forward primer (CTATAYCCACTTATCTTTTCRGGGA) byl navržen samostatně.

Za účelem ověření praktické využitelnosti izolované jaderné DNA byla zvolena amplifikace ITS oblasti (Internal Transcribed Spacer), která je standardně využívána pro identifikaci houbových patogenů (Schoch *et al.* 2012). Amplifikace cílového fragmentu o délce 210–230 bp umožňuje ověřit, zda je izolovaná DNA vhodná pro spolehlivou identifikaci přítomných hub ve dřevních pletivech.

PCR reakce byly provedeny v celkovém objemu 20 µl ve složení: qPCR 2x Blue Master Mix (Top–Bio), navržené specifické primery s danou finální koncentrací (Tabulka 1), 2 µl DNA. Reakce probíhaly v termocykleru Biorad C1000 s následujícím nastavením: 94 °C/5 min; 40x (94 °C/20 s, 52 °C/30 s a 72 °C/1 min 30 s) a finální elongace (72 °C/5 min) pro *rbcL* a *matK*; 95 °C/5 min; 40x (95 °C/30 s, 58 °C/30 s a 72 °C/30 s) a finální elongace (72 °C/5 min) pro ITS. PCR produkty byly analyzovány elektroforeticky na 2,5% (*rbcL*), 2% (*matK*) a 3% (ITS) agarózovém gelu v 0,5 X TBE pufru a vizualizovány pomocí Blue/Green LED dokumentačního systému FAS Digi-Pro (NIPPON Genetics) vybaveného fotoaparátem Canon 250D. Pro porovnání a stanovení délky amplikonů byl použit 700 bp a 10 000 bp DNA marker (Thermo Scientific). Získané amplikony ITS oblasti byly následně sekvenovány pomocí přístroje 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) a výsledné sekvence byly analyzovány pomocí online nástroje Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) dostupného na stránkách National Center for Biotechnology Information (2025) pro určení shody s referenčními sekvencemi.

Tabulka 1. Finální koncentrace forward a reverse primerů v PCR reakční směsi použitých pro amplifikaci *rbcL*, *matK* a ITS oblastí

Table 1. Final concentration of forward and reverse primers in the PCR reaction mixture used for the amplification of *rbcL*, *matK*, and ITS regions

	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS
Forward	0,5 µM	0,75 µM	0,25 µM
Reverse	0,5 µM	1 µM	0,25 µM

Vyhodnocení výsledků

Pro statistické zpracování dat byly použity t-test a jednocestná ANOVA s Tukeyho HSD testem. Statistická významnost byla posuzována na hladině $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Velikost hoblin

Pro získání materiálu s jemnou a homogenní strukturou byla zvolena metoda odběru hoblin pomocí vrtání do dřeva. Cílem bylo vyhodnotit vliv průměru vrtáku na velikost hoblin a zároveň stanovit potřebný počet vrtů k získání dostatečného množství materiálu pro izolaci DNA

(standardní navážka činí 100 mg). Pro ověření reprodukovatelnosti byly provedeny tři nezávislé izolace DNA (3 × 12 vzorků). Hobliny různé velikosti byly získány z řezných ploch špalků (Obrázek 2). Za účelem posouzení, který průměr vrtáku poskytuje nejvhodnější materiál pro následnou izolaci DNA, byl zvolen standardní protokol zavedený v naší laboratoři (homogenizace v tekutém dusíku, extrakční kit Exgene™ Plant SV mini od GeneAll) následovaný analýzou hodnot Ct pro chloroplastovou DNA. Nejlepší výsledky vyjádřené nejnižšími hodnotami Ct (17,64) byly získány při použití nejmenšího vrtáku o průměru 1,5 mm. Zároveň na souboru šesti vzorků bylo dosaženo nejnižšího rozptylu a vysoké reprodukovatelnosti hodnot Ct (variační koeficient = 4,2 %) a současně nejvyšší průměrné koncentrace DNA (0,444 ng/μl) (Tabulka 2). Na druhou stranu u malého vrtáku představuje nevýhodu vyšší počet potřebných vrtů na standardní navážku (až 10 vrtů), což prodlužuje dobu potřebnou k přípravě dostatečného množství hoblin (Tabulka 3). Pro rychlý odběr vstupního materiálu, kdy dostačuje provést jeden vrt, byl jako optimální vyhodnocen vrták o průměru 4 mm. Oproti vrtákům s vyšším průměrem dosáhl nejnižší průměrné hodnoty Ct. Při srovnání nejmenšího (1,5 mm) a největšího (6 mm) vrtáku byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v hodnotách Ct i koncentraci DNA. ANOVA test: Ct hodnoty ($p = 0,036$); koncentrace DNA ($p = 0,030$). Tukeyho HSD test: Ct hodnoty ($p = 0,042$); koncentrace DNA ($p = 0,028$). Hodnota Ct byla u nejmenšího vrtáku v průměru o téměř 2 cykly nižší, což svědčí o vyšším množství cílové DNA. Současně byla koncentrace DNA u vrtáku 1,5 mm téměř dvojnásobná oproti vrtáku 6 mm (Tabulka 2). Ukazuje se tedy, že velikost připravených hoblin je jedním z faktorů ovlivňujících výtěžnost DNA izolované ze dřeva.

Obrázek 2. Příklady vrtů pro odběr hoblin z řezné plochy kmene stromu meruňky. Čísla indikují průměr použitého vrtáku.

Figure 2. Examples of drill holes for collecting wood chips from the cutting surface of an apricot tree trunk. Numbers indicate the diameter of a drill bit used.



Tabulka 2. Vliv velikosti vrtáku na kvalitu izolované DNA ze dřeva vyjádřeno pomocí hodnoty Ct pro chloroplastový ribosomální gen a koncentrace DNA. Homogenizace hoblin byla provedena za pomoci tekutého dusíku ve třecí misce, izolace DNA kitem od výrobce GeneAll. Ct: cycle treshold, SD: směrodatná odchylka, VK: variační koeficient.

Table 2. The effect of drill bit size on the quality of isolated DNA from wood expressed using the Ct value for the chloroplast ribosomal gene and DNA concentration. Wood chips were homogenized using liquid nitrogen in a mortar, and DNA was isolated using a kit from GeneAll. Ct: cycle threshold, SD: standard deviation, VK: coefficient of variation.

	Velikost vrtáku (průměr) ¹⁾											
	1,5 mm		2 mm		3 mm		4 mm		5 mm		6 mm	
	Ct	DNA (ng/μl)	Ct	DNA (ng/μl)	Ct	DNA (ng/μl)	Ct	DNA (ng/μl)	Ct	DNA (ng/μl)	Ct	DNA (ng/μl)
	17,39	0,504	18,23	0,362	20,85	0,104	19,46	0,166	19,06	0,496	19,80	0,231
	17,13	0,416	16,76	0,440	21,93	0,119	20,23	0,220	21,00	0,159	21,36	0,184
	16,73	0,736	17,63	0,314	15,26	1,570	16,50	0,728	18,68	0,280	18,51	0,233
	19,02	0,284	19,40	0,171	20,24	0,129	18,45	0,242	20,67	0,096	18,82	0,272
	18,12	0,230	18,37	0,218	18,36	0,231	18,94	0,170	17,28	0,604	18,63	0,195
	17,42	0,496	18,10	0,372	16,80	0,349	19,90	0,135	16,87	0,496	18,51	0,436
Průměr ²⁾	17,64	0,444	18,08	0,313	18,91	0,417	18,91	0,277	18,93	0,355	19,27	0,259
SD	0,75	0,17	0,80	0,09	2,34	0,52	1,23	0,20	1,55	0,19	1,03	0,08
VK	0,042	0,372	0,044	0,295	0,124	1,253	0,065	0,740	0,082	0,530	0,054	0,326

1) Drill size (diameter), 2) Average

Tabulka 3. Počet vrtů potřebných k získání 100 mg jemného prášku homogenizací hoblin v tekutém dusíku

Table 3. Number of drillings required to obtain 100 mg of fine powder by homogenizing wood chips in liquid nitrogen

Velikost vrtáku (průměr) ¹⁾	1,5 mm	2 mm	3 mm	4 mm	5 mm	6 mm
Počet vrtů ²⁾	10	6	1-2	1	1	1

1) Drill size (diameter), 2) Number of drillings

Homogenizace hoblin a izolace DNA

Cílem provedeného experimentu bylo posoudit možný vliv mechanické homogenizace dřevních hoblin získaných z *Prunus armeniaca* L. na kvalitu extrahované DNA. Za tímto účelem byla testována kombinace dvou metod mechanické homogenizace a tří komerčních kitů pro izolaci DNA (GA, ZR, WS). K přípravě hoblin byl použit vrták o velikosti 4 mm. Byly porovnány dva způsoby homogenizace: i) standardně používané rozemletí rostlinných pletiv v třecí misce za přítomnosti tekutého dusíku a ii) pomocí kuličkového homogenizátoru s využitím komerčně dostupných zkumavek s drtícími kuličkami. Kvalita extrahované DNA byla posuzována dle několika indikátorů:

1. hodnoty Ct pro chloroplastový gen,
2. vizualizací PCR ampliconů cílových oblastí *rbcL* a *matK* na agarozovém gelu,
3. vizualizací PCR ampliconů cílové oblasti ITS na agarozovém gelu.

Hodnoty Ct pro chloroplastový gen

Výsledky hodnot Ct pro chloroplastový gen ukazují, že volba této přípravné fáze, tedy způsob homogenizace, může významně ovlivnit kvalitu a množství izolované DNA. Homogenizace v tekutém dusíku vedla u kitů WS a GA k nižším hodnotám Ct, což naznačuje vyšší výtěžnost (Tabulka 4 a 5). Nejvýraznější rozdíl byl zaznamenán u kitu WS, kde byla při použití tekutého dusíku dosažena průměrná hodnota Ct 17,00, zatímco při použití kuličkového homogenizátoru

činila 18,94 - rozdíl téměř 2 cykly. Tento rozdíl byl statisticky významný (t-test, $p = 0,0037$). Podobný trend byl pozorován i u kity GA (Ct 18,19 vs. 19,89). Naopak kit ZR vykazoval lepší výsledky při homogenizaci pomocí kuličkového homogenizátoru, kde dosáhl nižší variability (VK 3,9 %) a mírně nižší Ct oproti tekutému dusíku (Tabulka 5). To naznačuje, že efektivita homogenizace může být závislá na typu izolačního protokolu. Celkově se jako nejvhodnější kombinace jeví použití tekutého dusíku pro kity WS a GA, zatímco pro kit ZR je výhodnější homogenizace pomocí kuličkového homogenizátoru. To může být dáno i tím, že tento kit tyto homogenizační zkumavky obsahuje a byl optimalizován pro jejich použití.

V porovnání výsledků real-time PCR analýzy pro chloroplastový gen lze pozorovat výrazné rozdíly v hodnotách Ct mezi izolovanou DNA z dřevní části a z lýka. Historická data získaná v akreditované Laboratoři molekulární biologie VŠÚO Holovousy s.r.o. ukazují, že hodnoty Ct u lýka jako vstupního materiálu využívaného k diagnostice patogenů se u meruněk optimálně pohybují v rozmezí 9,5–12,2. Tato data byla získána opakovaným použitím metodiky izolace DNA z lýka a následné PCR analýzy chloroplastového genu, jak ji detailně popisují Rejlová *et al.* (2019), kde je detailně popsán metodický postup. Rozdíl v získaných hodnotách lze přičíst anatomickým a chemickým vlastnostem rostlinných pletiv. Lýko, jakožto vodivé pletivo s živými buňkami obsahuje méně ligninu a fenolických sloučenin než dřevo, které naopak představuje technicky náročný materiál, kde je vyšší riziko degradace nukleových kyselin a interference s PCR reakcí. Tento problém je zvláště výrazný u jádrového dřeva, kde převládají odumřelé buňky a DNA se nachází ve značně fragmentovaném stavu.

Tabulka 4. Kvalita izolované DNA ze dřeva vyjádřena pomocí hodnoty Ct pro chloroplastový gen. Homogenizace hoblin (vrták 4 mm) byla provedena pomocí tekutého dusíku ve třecí misce, izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). Ct: cycle treshold, SD: směrodatná odchylka, VK: variační koeficient.

Table 4. The quality of DNA extracted from wood expressed using the Ct value for the chloroplast gene. Homogenization of wood chips (4 mm drill bit) was performed using liquid nitrogen in a mortar, DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), and Wizbiosolutions (WS). Ct: cycle threshold, SD: standard deviation, VK: coefficient of variation.

Ct	4 mm A	4 mm B	4 mm C	4 mm D	4 mm E	4 mm F	Průměr ¹⁾	SD	VK
GA	16,22	16,3	17,29	19,83	20,17	19,31	18,19	1,64	0,090
ZR	23,71	23,5	24,09	22,4	22,37	20,14	22,70	1,31	0,058
WS	15,87	16,44	16,38	17,86	17,65	17,82	17,00	0,80	0,047
Delta Ct Kit-GA							Průměr ¹⁾		
ZR	7,49	7,2	6,8	2,57	2,2	0,83	4,52		
WS	-0,35	0,14	-0,91	-1,97	-2,52	-1,49	-1,18		

1) Average

Vizualizace PCR amplikonů cílových oblastí *rbcL* a *matK* na agarozovém gelu pro druhovou identifikaci rostlin

Za účelem posouzení vlivu různých metod mechanické homogenizace a izolačních protokolů na fragmentaci získané DNA byly provedeny dvě samostatné PCR analýzy cílené na různě dlouhé amplikony genů *rbcL* a *matK*. Výsledky byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy, která umožnila porovnat míru fragmentace DNA a úspěšnost amplifikace jednotlivých genových oblastí. Amplifikace kratšího cílového fragmentu genu *rbcL* byla úspěšná ve všech vzorcích, přičemž nejvýraznější signál vykazoval vzorek č. 6 homogenizovaný v tekutém dusíku a izolovaný kitem od Wizbiosolutions (6. WS_N) a naopak nejnižší intenzita byla pozorována u vzorku č. 2 homogenizovaného v tekutém dusíku a izolovaného kitem od Zymo Research (2. ZR_N) a vzorku č. 8 homogenizovaného v kuličkovém homogenizátoru a izolovaného kitem od Zymo Research (8. ZR_B) (Obrázek 3). Tyto výsledky korespondují

s předchozími závěry získanými metodou real-time PCR, která rovněž indikovala rozdíly v kvalitě izolované DNA mezi jednotlivými protokoly. Amplifikace delšího úseku genu *matK*, jehož cílový fragment dosahuje délky přibližně 1300 bp, byla úspěšná pouze u části vzorků (Obrázek 4). Pouze u kitu od Wizbiosolutions byly amplifikovány všechny 4 vzorky, což naznačuje kvalitnější vstupní DNA. U části vzorků izolovaných pomocí kitů od GeneAll a Zymo Research nejsou při žádné z použitých metod homogenizace viditelné výrazné amplikony (vz. č. 1, 5), případně zcela chybí (vz. č. 2, 7, 8). Tato zjištění mohou souviset s nižší výtěžností nebo částečnou fragmentací DNA.

Tabulka 5. Kvalita izolované DNA ze dřeva vyjádřena pomocí hodnoty Ct pro chloroplastový gen. Homogenizace hoblin byla provedena pomocí kuličkového homogenizátoru, izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). Ct: cycle threshold, SD: směrodatná odchylka, VK: variační koeficient.

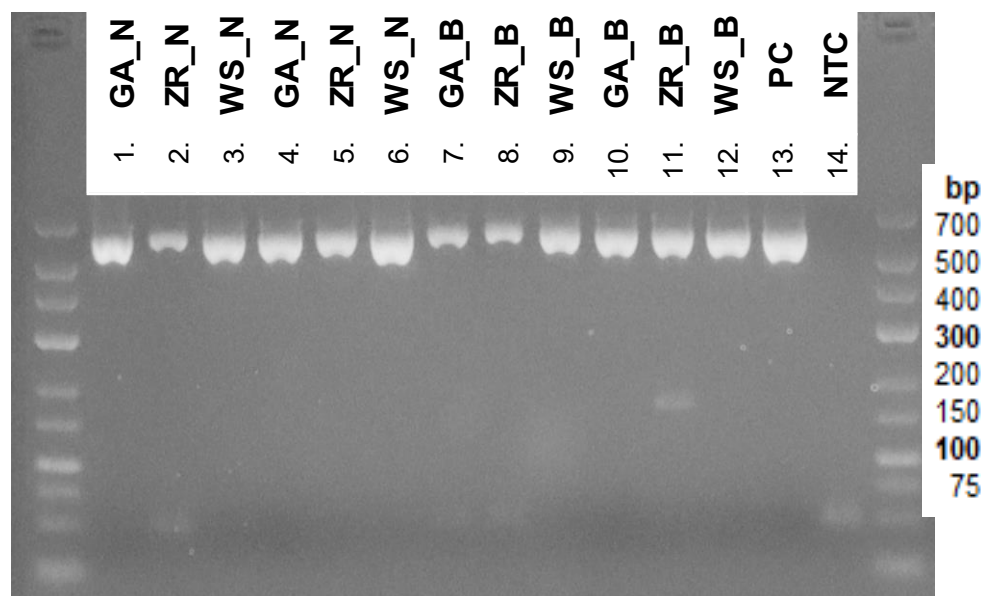
Table 5. The quality of DNA extracted from wood expressed using the Ct value for the chloroplast gene. Homogenization of wood chips (4 mm drill bit) was performed using ball mill homogenizer, DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), and Wizbiosolutions (WS). Ct: cycle threshold, SD: standard deviation, VK: coefficient of variation.

Ct	4 mm A	4 mm B	4 mm C	4 mm D	4 mm E	4 mm F	Průměr ¹⁾	SD	VK
GA	20,04	21,34	17,31	20,79	22,47	17,38	19,89	1,94	0,097
ZR	22,56	21,66	21,59	23,16	22,21	20,43	21,94	0,86	0,039
WS	19,72	19,02	17,54	19,96	19,61	17,81	18,94	0,94	0,050
Delta Ct Kit-GA							Průměr ¹⁾		
ZR	2,52	0,32	4,28	2,37	-0,26	3,05	2,05		
WS	-0,32	-2,32	0,23	-0,83	-2,86	0,43	-0,95		

1) Average

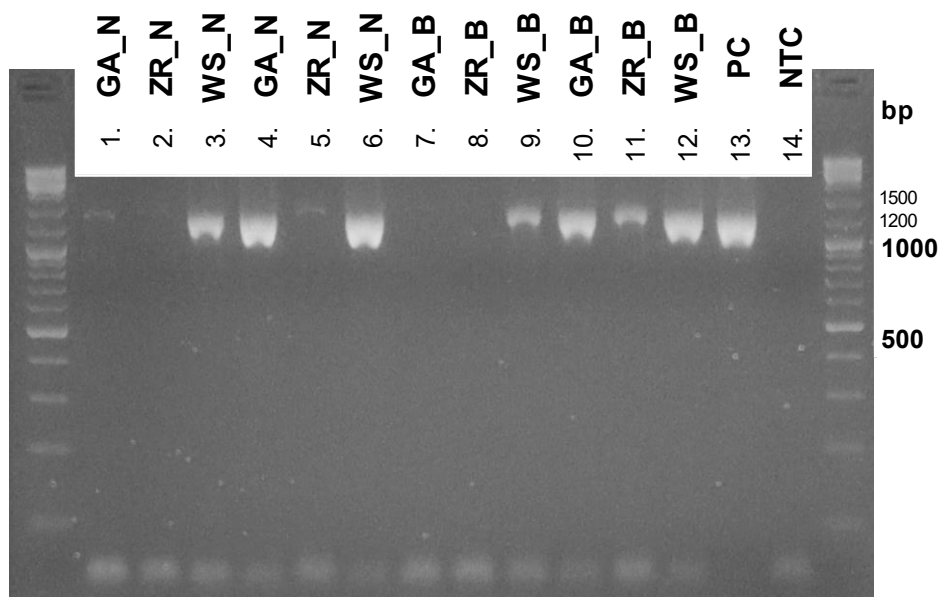
Obrázek 3. Gelová elektroforéza PCR amplikonů pro oblast genu *rbcl*. Homogenizace v tekutém dusíku (N) nebo pomocí kuličkového homogenizátoru (B), izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). PC - pozitivní kontrola, NTC - netemplátová kontrola.

Figure 3. Gel electrophoresis of PCR amplicons for the *rbcl* gene region. Homogenization in liquid nitrogen (N) or using a ball mill (B), DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). PC - positive control, NTC - no template control.



Obrázek 4. Gelová elektroforéza PCR ampliconů pro oblast genu *matK*. Homogenizace v tekutém dusíku (N) nebo pomocí kuličkového homogenizátoru (B), izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). PC - pozitivní kontrola, NTC - netemplátová kontrola.

Figure 4. Gel electrophoresis of PCR amplicons for the *matK* gene region. Homogenization in liquid nitrogen (N) or using a ball mill (B), DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). PC - positive control, NTC - no template control.



Vizualizace PCR ampliconů cílové oblasti ITS na agarozovém gelu pro druhovou identifikaci hub

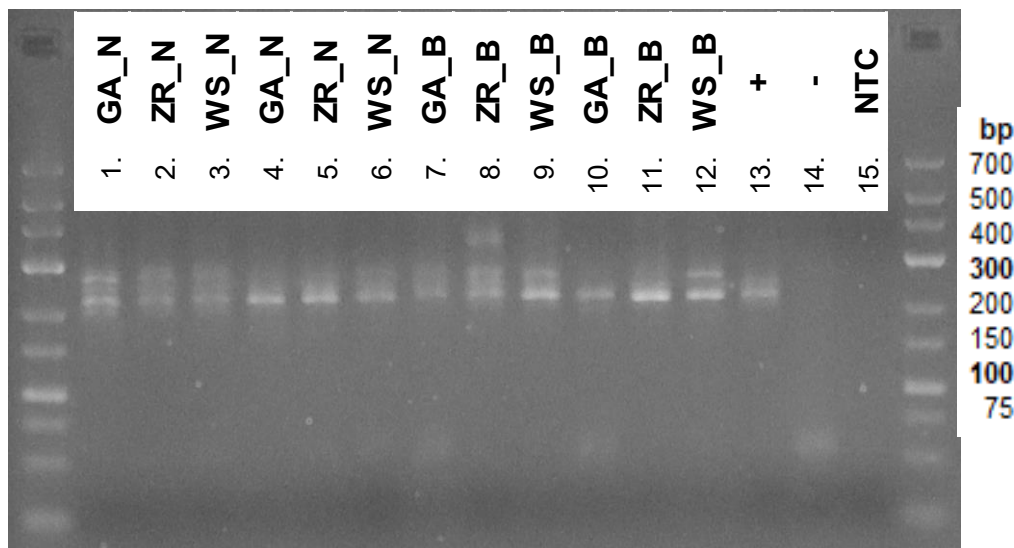
Za účelem praktického ověření metodiky izolace rDNA z dřevních pletiv byla provedena PCR amplifikace ITS oblasti (~210–230 bp) běžně využívané pro druhovou identifikaci hub. Amplifikace byla úspěšná u všech analyzovaných vzorků (Obrázek 5), což prokázalo přítomnost houbové DNA v testovaném materiálu. Vzorek č. 11 homogenizovaný kuličkovým homogenizátorem a izolovaný kitem od Zymo Research (11. ZR_B) a vzorek č. 12 homogenizovaný kuličkovým homogenizátorem a izolovaný kitem od Wizbiosolutions (12. WS_B) byly ověřeny sekvenčně. Získané sekvence odpovídaly druhu *Cladosporium cladosporioides* (čerň černá), původci tzv. černé plísně. Tento rod patří mezi časté kolonizátory dřevních pletiv a je spojován se změnou zbarvení bělového dřeva (Lee *et al.* 2012).

Volba délky ampliconu se odvíjí od zamýšleného účelu analýzy. Kratší fragmenty zpravidla vykazují vyšší úspěšnost amplifikace, zejména u vzorků s degradovanou DNA. Amplifikace delších úseků (>1000 bp) poskytuje detailnější taxonomické a fylogenetické informace, neboť zahrnuje jak konzervované, tak vysoce variabilní oblasti. Příkladem je použití primerů ITS1F/LR3, které generují fragment o délce přibližně 1100–1150 bp zahrnující celý ITS region a první dvě domény LSU (Large Subunit) (Raja *et al.* 2017). Pro bakteriální patogeny je analogicky nejčastěji využíván gen 16S rRNA o délce přibližně 1500 bp. Kombinace primerů 27F/1492R umožňuje amplifikaci téměř celého genu, což poskytuje robustní základ pro identifikaci a taxonomickou klasifikaci širokého spektra bakterií (Weisburg *et al.* 1991). Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že při použití vhodného protokolu izolace DNA z dřevních pletiv je možné získat genomovou DNA dostatečné kvality a integrity nejen pro amplifikaci kratších úseků, ale i pro úspěšnou amplifikaci delších fragmentů

vhodných pro druhovou identifikaci a fylogenetické analýzy mikroorganismů kolonizujících dřevo.

Obrázek 5. Gelová elektroforéza PCR ampliconů pro oblast ITS. Homogenizace v tekutém dusíku (N) nebo pomocí kuličkového homogenizátoru (B), izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). + pozitivní kontrola, - negativní kontrola, NTC netemplátová kontrola.

Figure 5. Gel electrophoresis of PCR amplicons for the ITS region. Homogenization in liquid nitrogen (N) or using a ball mill (B), DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). + positive control, - negative control, NTC - no template control.



Tabulka 6. Přehled výsledků izolace DNA z dřevních pletiv. Homogenizace v tekutém dusíku (N) nebo pomocí kuličkového homogenizátoru (B), izolace DNA kity od výrobce GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). Uvedeny jsou hodnoty Ct: cycle treshold, koncentrace DNA (ng/μl) a úspěšnost amplifikace tří markerových genů (*rbcL*, *matK*, ITS) vyjádřená semikvantitativně (+++ silný signál, ++ střední, + slabý, – bez amplifikace).

Table 6. Overview of DNA extraction results from wood tissue. Homogenization in liquid nitrogen (N) or using a ball mill (B), DNA isolation kits from GeneAll (GA), Zymo Research (ZR), Wizbiosolutions (WS). The values shown include Ct: cycle threshold, DNA concentration (ng/μl), and amplification success of three marker genes (*rbcL*, *matK*, ITS) expressed semi-quantitatively (+++ strong signal, ++ medium, + weak, – no amplification).

Kit_Homogenizace	Ct	DNA (ng/μl)	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS
1. GA_N	19,83	0,127	++	+	++
2. ZR_N	22,40	0,046	+	-	+
3. WS_N	17,86	0,170	++	++	+
4. GA_N	16,22	0,860	++	+++	++
5. ZR_N	23,71	0,026	++	+	++
6. WS_N	15,87	0,968	+++	+++	+
7. GA_B	20,79	0,059	+	-	+
8. ZR_B	23,16	0,072	+	-	+
9. WS_B	19,96	0,142	++	++	+++
10. GA_B	17,38	0,262	++	+++	+
11. ZR_B	20,43	0,094	++	++	+++
12. WS_B	17,81	0,404	++	+++	+++

Tabulka 6 poskytuje souhrnný přehled získaných dat, z nichž vyplývá, že izolační kit WS ve spojení s oběma metodami homogenizace umožňuje získat DNA nejvyšší kvality, která je vhodná pro amplifikaci dlouhých sekvencí. Výsledky jednoznačně potvrzují, že volba homogenizace dřevních hoblin a izolačního protokolu představuje klíčový faktor ovlivňující úspěšnost následných molekulárních analýz.

ZÁVĚR

Výsledky této studie ukazují, že efektivní izolace DNA ze dřeva ovocných stromů je podmíněna nejen volbou izolačního protokolu, ale také fyzikálními parametry odběru, jako jsou velikost hoblin a způsob mechanického zpracování vzorku. Identifikace optimální kombinace těchto faktorů umožňuje získat DNA dostatečné kvality i z technicky náročného vstupního materiálu, jako je dřevo, což rozšiřuje možnosti standardizovat molekulárně-biologické analýzy z tohoto typu materiálu. Získané poznatky mají praktický význam pro diagnostiku patogenů lokalizovaných v xylému, ale také pro aplikace DNA barcodingu v případech, kdy není dostupné vhodnější rostlinné pletivo (např. listy, lýko). Studie zároveň otevírá prostor pro další výzkum zaměřený na izolaci DNA ze starších, sušených nebo jinak degradovaných vzorků dřeva ovocných stromů, které představují výzvu pro rutinní laboratorní postupy.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory RO1525 poskytnutém Ministerstvem zemědělství České republiky. Poděkování patří laborantkám Lence Křivohlávkové a Lence Tůmové za precizní práci odvedenou při realizaci experimentů v laboratoři PCR.

LITERATURA

- BOLD SYSTEMS. *Identifying species through DNA barcodes. v4.boldsystems.org. DATABASES Primers. Primer Search* [online]. BOLD, © 2014–2025. Dostupné z: <https://boldsystems.org/> [cit. 30. 10. 2025].
- BRUEZ, E.; HAIDAR, R.; ALOU, M. T.; VALLANCE, J.; BERTSCH, C.; MAZET, F.; FERMAUD, M.; DESCHAMPS, A.; GUERIN-DUBRANA, L.; COMPANT, S. a REY, P. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2015, vol. 6, p. 1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01137> [cit. 28. 5. 2025].
- CBOL PLANT WORKING GROUP 1, HOLLINGSWORTH, P. M.; FORREST, L. L.; SPOUGE, J. L.; HAJIBABAEI, M.; RATNASINGHAM, S. *et al.* A DNA barcode for land plants. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, vol. 106, no. 31, p. 12794–12797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106> [cit. 28. 8. 2025].
- DEGUILLOUX, M.; PEMONGE, M. a PETIT, R. Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. Online. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2002, vol. 269, no. 1495, p. 1039–1046. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1982> [cit. 15. 9. 2025].
- GENEALL BIOTECHNOLOGY. Exgene™ Plant SV (Ver 2.2). Handbooks. Protocols. Exgene™ Plant SV. Genomic DNA. Products. Geneall.com [online]. Dostupné z: GeneAll Biotechnology Co., Ltd., © 2025 [cit. 28. 8. 2025].
- JIAO, L.; LU, Y.; HE, T.; GUO, J. a YIN, Y. DNA barcoding for wood identification: global review of the last decade and future perspective. Online. *IAWA Journal*. 2020, vol. 41, no. 4, p. 620–643. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/22941932-bja10041> [cit. 3. 9. 2025].

- KRESS, W. J.; ERICKSON, D. L.; JONES, F. A.; SWENSON, N. G.; PEREZ, R.; SANJUR, O. a BERMINGHAM, E. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, vol. 106, no. 44, p. 18621–18626. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106> [cit. 15. 9. 2025].
- LEE, Y. M.; JANG, Y.; KIM, G. H. a KIM, J. J. Phylogenetic analysis and discoloration characteristics of major molds inhabiting woods. Part 3. Genus *Cladosporium*. Online. *Holzforschung*. 2012, vol. 66, p. 537–541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/hf.2011.184> [cit. 15. 9. 2025].
- LOWE, A. J. a CROSS, H. B. The Application of DNA methods to Timber Tracking and Origin Verification. Online. *IAWA journal*, 2011, vol. 32, no. 2, p. 251–262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/22941932-90000055> [cit. 15. 9. 2025].
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [online]. Dostupné z: National Library of Medicine, © 2025. [cit. 11. 9. 2025].
- NAVRÁTIL, M.; ŠAFÁŘOVÁ, D.; ČMEJLA, R.; DUCHOSLAV, M. a SEDLÁK, J. High-Throughput Sequencing Reveals Fungal Microbiome of Apricots Grown Under Organic and Integrated Pest Management Systems. Online. *Agriculture*, 2025, vol. 15, no. 17, p. 1825. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agriculture15171825>. [cit. 11. 9. 2025].
- RACHMAYANTI, Y.; LEINEMANN, L.; GAILING, O. a FINKELDEY, R. DNA from processed and unprocessed wood: factors influencing the isolation success. Online. *Forensic Science International: Genetics*. 2009, vol. 3, no. 3, p. 185–192. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.002>. [cit. 15. 9. 2025].
- RAJA, H. A.; MILLER, A. N.; PEARCE, C. J. a OBERLIES, N. H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. Online. *Journal of natural products*. 2017, vol. 80, no. 3, p. 756–770. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085> [cit. 15. 9. 2025].
- REJLOVÁ, M.; VALENTOVÁ, L. a ČMEJLA, R. Zvýšení citlivosti detekce *Candidatus* Phytoplasma spp. skupiny 16SrX metodou real-time PCR s využitím RNA jako zdrojového materiálu. Online. *Vědecké práce ovocnářské*. 2019, vol. 26, p. 107–115. Dostupné z: https://vpovsuo.cz/wp-content/uploads/2021/02/14-VPO-26-Rejlova_Zvyseni-citlivosti-detekce.pdf [cit. 29. 10. 2025].
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, vol. 109, no. 16, p. 6241–6246. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109> [cit. 28. 8. 2025].
- SPETIK, M.; PECENKA, J.; STUSKOVA, K.; STEPANOVA, B.; EICHMEIER, A. a KISS, T. Fungal trunk diseases causing decline of apricot and plum trees in the Czech Republic. Online. *Plant Disease*. 2024, vol. 108, no. 6, p. 1425–1436. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-23-1080-SR> [cit. 11. 9. 2025].
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. a LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Online. *Journal of bacteriology*. 1991, vol. 173, no. 2, p. 697–703. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991> [cit. 16. 9. 2025].
- WIZBIOSOLUTIONS. WizPrep™ Plant DNA Mini Kit. DNA prep (Spin column). DNA/RNA Purification. Reagents. [Wizbiosolutions.com](https://www.wizbiosolutions.com) [online]. Dostupné z: Wizbiosolutions Inc., © 2021 [cit. 28. 8. 2025].
- YU, X. L.; HU, X. Y.; WANG, X. X.; ZHANG, X. Y. a DU, K. B. A protocol specialized for microbial DNA extraction from living poplar wood. Online. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2022, vol. 50, no. 4, p. 12822–12822. Dostupné z: <https://doi.org/10.15835/nbha50312822> [cit. 15. 9. 2025].
- ZYMO RESEARCH CORPORATION. Quick DNA Plant/Seed Miniprep Kit. Quick DNA Plant/Seed Kits. DNA. All Products. [Zymoresearch.eu](https://www.zymoresearch.eu) [online]. Dostupné z: Zymo Research Corporation, © 2025. [cit. 28. 8. 2025].