Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

ING. SÁRA BRÁZDOVÁ

České Budějovice
2024

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. Sára Brázdová

Studijní program: Biotechnologie

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Název práce: Bakteriofágy jako biopesticidy proti vybraným patogenním bakteriím infikujícím hospodářské plodiny

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc

Oponenti: Ing. Martin Žabka, Ph.D.
prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.
prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

Abstrakt

Vznikající rezistence na antibiotika a další bakteriocidy vede k hledání nových cest v boji proti bakteriálním onemocnění. Tato disertační práce popisuje nové viry využitelné jako biopesticidy v ochraně hospodářských plodin jako jsou brambory, sója, zelí a rajčata. V rámci výzkumu myly izolovány a analyzovány fágy specifické pro bakterie *Dickeya solani*, *Kosakonia cowanii*, *Pectobacterium parmentieri*, *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. U fágů byla zjištěna genomová sekvence a jejich základní charakteristika. Fágy Xe_PB119, Ds3CZ a Ds20CZ byly testovány v laboratorních a polních podmínkách, což vedlo k úspěšné aplikaci fágů jako biopesticidů. Dále byly zkoumány lytické geny fága Xe_NED111, které byly exprimovány a prokázaly svůj antimikrobiální účinek.

Klíčová slova: bakteriofág, bakteriální infekce, biopesticidy

Abstract

Emerging resistance to antibiotics and other bacteriocides is leading to the search for new ways to combat bacterial diseases. This dissertation describes new viruses for use as biopesticides in the protection of economic crops such as potatoes, soybeans, cabbage and tomatoes. In the framework of the research, phages specific for *Dickeya solani*, *Kosakonia cowanii*, *Pectobacterium parmentieri*, *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were isolated and analysed. The genomic sequence and basic characteristics of the phages were determined. Phages Xe_PB119, Ds3CZ and Ds20CZ were tested under laboratory and field conditions leading to successful application of the phages as biopesticides. Furthermore, the lytic genes of phage Xe_NED111 were investigated and expressed and demonstrated their antimicrobial effect.

Keywords: bacteriophage, bacterial infection, biopesticide

1 Úvod

Plodiny hrají základní roli v každodenním životě člověka. Lidská populace roste a je proto nezbytné zaměřit pozornost na dostupné zdroje potravy a zároveň na efektivitu jejich využívání. V přirozeném prostředí musí rostliny velmi často čelit hrozbě v podobě různých škůdců a onemocnění. Existuje několik typů rostlinných patogenů, jimiž jsou bakterie, houby a viry, které způsobují rozsáhlá rostlinná onemocnění ústící ve vysoké ekonomické ztráty. Největší dopad mají bakterie rodů *Pseudomonas, Ralstonia, Agrobacterium, Xanthomonas, Erwinia, Xylella, Pectobacterium* a *Dickeya*.

Používanou obranou proti bakteriálním onemocněním je pouze několik baktericidů. Problematiku dále komplikuje variabilita patogenů, vysoká pravděpodobnost mutace, vysoká míra přenosu genů mezi patogeny i nárůst bakteriální populace během optimálních podmínek pro rozvoj onemocnění.

Baktericidy, jako jsou antibiotika a přípravky na bázi těžkých kovů, byly používány k boji s bakteriálním onemocněním. Nevhodné používání, nesprávná aplikace a nadužívání těchto přípravků vedlo k rozvoji rezistentních bakteriálních kmenů. Východiskem z uvedené situace je hledání alternativních, dlouhodobě udržitelných a bezpečných cest k ochraně rostlin proti bakteriálním chorobám. Jedním z těchto přístupů je využití bakteriofágů jako slibného a znovu se rozvíjejícího postupu léčby bakteriálních onemocnění rostlin.

2 Cíle práce a hypotézy

Tato práce byla primárně zaměřena na hledání bakteriofágů infikujících významné hospodářské plodiny a jejich charakteristiku.

Dílčími cílí bylo:

- Sběr vzorků půdy
- Najít bakteriofágy infikující bakterie *Dickeya solani*, *Pectobacterium parmentieri*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* a *Kosakonia cowanii*
- Nalezené fágy purifikovat a sekvenovat
- Získat základní biologické charakteristiky jednotlivých fágů

Hypotézy:

- Bakteriofágy jsou všudypřítomné a jejich izolace je snadná
- Použití fágů ochrání rostliny a sníží se ztráty
- Jsou využitelné jako prevence i léčba bakteriálních onemocnění

3 Materiál a metodika

3.1 Vzorkování

Zdrojem všech fágů byla půda, zbytky rostlin, odpadní voda, a to převážně z míst, kde se dané plodiny pěstovaly. K odebraným vzorkům bylo přidáno LB médium a vzorky byly 16 hodin kultivovány při pokojové teplotě na rotátoru. Po odstředění a filtraci přes bakteriální filtr byly filtráty testovány na přítomnost specifických bakteriofágů nakapáním 1-5 µl na vrstvu měkkého agaru s přídavkem dané bakterie. Přítomnost projasněné zóny po kultivaci misek signalizovala přítomnost bakteriofágů. Pravděpodobný bakteriofág byl z projasněné zóny odebrán párátkem, naředěn ve fágovém pufru a pasážován na hostitelské bakterii. Po 3-5 pasážích byl fág považován za oddělený a jedinečný.

3.2 Purifikace

Purifikáty fágů byly připravovány lyzí tekuté bakteriální kultury (obvykle 200 ml kultury na začátku exponenciální fáze růstu), která byla inokulována odděleným fágem. Po 16 hod kultivaci při pokojové teplotě byla lyze ukončena přidáním 1 % chloroformu a fágy byly z lyzátu precipitovány při 10 °C v prostředí 4 % NaCl a 10 % PEG 6000. Pelet po centrifugaci byl rozpuštěn ve fágovém pufru a uchováván při 10 °C.

3.3 Extrakce fágové DNA

K extrakci DNA z purifikátů fágů byl používán kit DNAlego (Top-Bio, Praha) s tím, že mu předcházelo odstranění kontaminujících RNA štěpením RNázou I a štěpení fágového kapsidu Proteinázou K. Kvalita extrahované DNA a její koncentrace byly měřeny na spektrofotometru.

3.4 Sekvenování a zpracování dat

Sekvenování genomů nalezených fágů bylo prováděno firmou Eurofins Genomics (Německo) technologií next-generation sequencing na platformě Illumina při obousměrném čtení o délce 250 nukleotidů. Hrubá data byla zpracována programy z balíku CLC Genomics Workbench v.8 a de novo byly z nich složeny kontigy. Z nich byly pak porovnáním s databází GenBank vybrány ty, které byly identifikovány jako virové. Anotace obsahu kontigů (identifikace genů, tRNA a dalších komponent) byla

prováděna na serveru RAST. HHpred a BLASTp byly použity pro zjištění funkcí jednotlivých genů. Podobnost s již známými fágy byla analyzována programem ViP Tree.

3.5 Detekce bakteriofágů

V případě, kdy bylo nutné prokázat přítomnost konkrétního bakteriofága v prostředí, v rostlině, ve směsi, byla pro detekci používána PCR amplifikace se specifickými detekčními primery navrženými na základě zjištěných genomových sekvencí jednotlivých fágů. Použití primerů je uvedeno v detailech v jednotlivých publikacích.

3.6 Hostitelské spektrum fágů

Hostitelské spektrum fágů bylo zjišťováno metodou kapání purifikátů na vrstvu měkkého agaru obsahující danou bakterii nebo daný kmen bakterie. Obvykle byly testovány další námi nalezené kmeny hostitelské bakterie, sbírkový kmen typové bakterie, jen zřídka pak příbuzné druhy.

3.7 Kinetika fágů v tekutém prostředí

Rychlost lyze bakterií v tekutém médiu, vliv multiplicity infekce na lyzi apod. byla sledována v uspořádání v ELISA destičce v objemech 200 µl a měřením absorbance při 405 nm v závislosti na čase.

3.8 Elektronová mikroskopie

Fágové purifikáty získané precipitací NaCl/PEG6000 byly negativně barveny 2 % uranylacetátem a pozorovány elektronovým mikroskopem JEOL1010.

3.9 Skladování bakteriofágů

Ke vzorkům půdy bylo přidáno tekuté LB médium a po dobu 16 h se vzorky kultivovaly při pokojové teplotě na orbitálním rotátoru. Supernatant byl poté přefiltrován přes bakteriální filtr (0,22 µm) a skladován v lednici při teplotě 7 °C. Přítomnost fága byla detekována na Petriho miskách v měkkém agaru.

3.10 Lytické geny

Jednotlivé lytické geny fága Xe_NED111 (endolyzin, holin, i-spanin, o-spanin) byly amplifikovány PCR reakcí. PCR produkty byly vizualizovány na 1 % agarovém gelu a následně přečištěny přes kolonku Jena Bioscience. Sekvence genu byla ověřena pomocí Sangerova sekvenování (Eurofins Genomics servis). Tyto produkty byly dále klonovány do TOPO vektoru a následně transformovány do TOP10 buněk *E. coli* (Champion pET™ Directional TOPO® Express Kits, Invitrogen) a kultivovány na Petriho misce s přítomností karbenicilinu (50 µg/ml) při 37 °C po dobu 16 h. Narostlé kolonie byly druhý den ověřovány na přítomnost plazmidu s požadovaným konstruktem pomocí PCR se specifickými primery a sekvenováním. Vybrané a otestované kolonie byly kultivovány na Petriho miskách při 37 °C po dobu 16 h. Následně byly jejich plazmidy izolovány alkalickou lyzí a ověřeny pomocí PCR. Plazmidy byly transformovány do buněk *E. coli* BL21 Star (Champion pET™ Directional TOPO® Express Kits, Invitrogen), kultura byla následně inkubována aerobně v tekutém TSB médiu (MERCK).

Exprese proteinů byla indukována pomocí 1 mM IPTG v tekutém médiu při 28 °C po dobu 16 h. Izolace jednotlivých proteinů probíhala pomocí His GraviTrap TALON kolonek (GE Healthcare). Proteiny byly izolovány za nativních i denaturovaných podmínek v přítomnosti močoviny a ß-merkaptoetanolu v pufru. Vlastní izolaci proteinu předcházela sonikace – 10× 30 sekund sonikace + 30 sekund v ledu. Kvůli přítomnosti solí v pufrech při izolaci byly izolované proteiny dialyzovány po dobu 24 h.

Přítomnost exprimovaného proteinu byla ověřena Dot Blot hybridizací. Hybridizace probíhala na nitrocelulózové membráně reakcí s anti-6xHis myšími primárními protilátkami a zviditelněna reakcí sekundárních protilátek (anti-mouse s navázanou alkalickou fosfatázou) a NTB/BCIP substrátem.

3.11 Biologická ochrana rajčat fágem Xe_PB119

Polní pokus se konal v letní sezoně 2024 na pozemcích biofarmy Sady sv. Prokopa v Temelíně, v nadmořské výšce 500 m.n.m.

Do testování byly vybrány rostliny odrůdy Gourmelito vypěstované z komerčních semen.

Rostliny byly pěstovány 45 dní ve sklenících při teplotě 24 °C. Týden před výsadbou na pole byly rostliny rozděleny na třetiny. K první třetině bylo ke každé rostlině přidáno v zálivce 50 ml roztoku bakterie *Xanthomonas euvesicatoria* 1940 o koncentraci 10^5/ml, ke druhé třetině bylo přidáno 50 ml roztoku bakteriofága Xe_PB119 o koncentraci 10^6/ml a současně roztok bakterie a třetí třetina byla bez zásahu. V každém pokusném zásahu bylo ošetřeno 35 rostlin. Rostliny byly vysazeny na pozemek bez krycí folie, průběžně odplevelovány a uvazovány k tyčkovým oporám (foto 1).

Foto 1 Polní pokus ochrany rajčat fágem Xe_PB119

První plody byly sklizeny 6.8.2024. U plodů byl vizuálně vyhodnocován zdravotní stav, celková hmotnost plodů, průměrná hmotnost plodu a počet plodů na jednu rostlinu. Ke statistickému vyhodnocení byla použita data z 5 sklizní od 6.8. do 3.9.2024.

3.12 Laboratorní testování fágů infikující *D. solani*

Hlíz brambor citlivých k bakteriím způsobující měkkou hnilobu brambor byly omyty vodou pro odstranění zbytků půdy, dezinfikovány 70 % etanolem a sušeny po dobu 30 minut. Hlízy byly nakrájeny na plátky přibližně 10 mm silné a uskladněny v uzavíratelných boxech. Na plátky hlíz byl nanesen fágový roztok (10^8 PFU/ml) o objemu 200 ml. Poté byl na hlízy položen sterilní papír 9 x 9 mm a na něj byl nakapán bakteriální roztok *D. solani*. Boxy byly uzavřeny a kultivovány tři dny při 21 °C.

Dále byla testována účinnost různých koncentrací fágů proti bakterii *Dickeya solani*. Zdravé hlízy brambor odrůdy Red Anna byly dezinfikovány 1 % chlornanem sodným po dobu 15 minut, dále omyty sterilní vodou a zanechány při pokojové teplotě přes noc. Fágový koktejl skládající se 1:1 z fágů Ds3CZ a Ds20CZ byl po 200 µl

v koncentracích 10^6, 10^7 a 10^8 PFU/ml aplikován na plátky brambor. Poté se na plátky umístil filtrační papír o velikosti 6 mm inokulovaný bakteriální kulturou o koncentraci 10^5 PFU/ml.

Na hlízách brambor bylo testováno pořadí aplikace fága a bakterie. Konce stonků a oblasti pupenů hlíz byly propíchnuty ocelovým rydlem. Do těchto ran byl nakapán fágový roztok, poté byla aplikována bakteriální suspenze. Na dalších hlízách byl test proveden naopak nejdříve byla aplikována bakteriální kultura, poté fág. Hlízy byly uskladněny při 21 °C v boxech a temnu. Z výsledků je patrné, že pokud je fág aplikován před bakteriální kulturou dochází k lepší ochraně hlíz brambor, než pokud dojde infekci bakteriální kulturou před ošetřením fágem. Pozitivní je, že i v případě pozdější aplikace fága dojde ke snížení infekce.

3.13 Biologická ochrana brambor

Polní pokus probíhal ve Valečově na Vysočině. V tomto pokusu byla provedena inokulace bakteriální kulturou *D. solani*, a to buď v podobě silné bakteriální infekce příčným rozříznutím hlíz brambor nebo slabou bakteriální infekcí propíchnutím hlíz a následným zasazením hlíz na pole.

4 Výsledky

V rámci disertační práce bylo objeveno 21 nových fágů infikujících bakterie *D. solani, P. parmentieri, X. campestris* pv. *campestris, X. euvesicatoria* a *K. cowanii.* Jejich seznam, taxonomická klasifikace a základní charakteristika je popsána v tabulkách 1, 2 níže.

Fág	**říše**	**kmen**	**třída**	**řád**	**čeleď**	**podčeleď**	**rod**
Ds3CZ	Duplodnaviria	Heunggongvirae	Uroviricota	Caudoviricetes	Ackermannviridae	Aglimvirinae	Limestonevirus
Ds5CZ							
Ds9CZ							
Ds16CZ							
Ds20CZ							
Ds23CZ							
Ds25CZ							
PcCB251					Autographiviridae	Studiervirinae	Berlinvirus
Kc166A							Kayfunavirus
Kc318						Melnykvirinae	Cronosvirus
Kc261						-	Bonnellvirus
Xe_NED111						-	Pradovirus
Kc304					Straboviridae	Tevenvirinae	Winklervirus
Kc305							Kanagawavirus
Kc283					Schitoviridae	-	Cbunavirus
Xe_PB119						-	Pokkenvirus
PcCB7V					-	Vequintavirinae	Certrevirus
Kc263					-	-	Branisovskavirus
Kc166B					-	-	-
Kc237					-	-	Sortsnevirus
M29					-	-	Foxunavirus

Tabulka 1 Přehled klasifikace fágů

	Velikost genomu (pb)	G+C (%)	ORF	Velikost hlavy (průměr)	Krček (délka)	Latentní perioda (min)	Fágový výnos (PFU/buňka)
Ds3CZ	155 285	49,1	206	80 nm	120 nm	50	100
Ds5CZ	154 722	49,1	204				
Ds9CZ	154 716	49,1	203				
Ds16CZ	152 837	49,2	202				
Ds20CZ	154 720	49,1	204				
Ds23CZ	149 364	49,4	194				
Ds25CZ	151 710	49,1	198				
PcCB251	40 557	48,6	47	-	krátký	60	120
Kc166A	41 374	52,7	55	50 nm	krátký	30	180
Kc318	41 938	55,5	47	50 nm	krátký	40	90
Kc261	42 203	55,4	54	50 nm	krátký	60	80
Xe_NED111	44 424	61,8	58	53 nm	krátký	60	50
Kc304	171 207	38,5	272	70 x 107 nm	115 nm	-	-
Kc305	147 783	40	295	-	-	-	-
Kc283	76 232	46,9	91	-	-	-	-
Xe_PB119	76 147	55,1	83	83 nm	krátký	40	500
PcCB7V	146 054	50,4	269	50 nm	100 nm	45	95
Kc263	253 740	45,5	259	96 nm	175 nm	-	-
Kc166B	40 785	57,4	54	60 nm	krátký	40	100
Kc237	40 897	59,4	57	60 nm	bez	40	100
M29	42 891	59,6	69	60 nm	170 nm	-	-

Tabulka 2 Přehled některých vlastností nalezených fágů

4.1 Fágy infikující bakterii Dickeya solani

Bylo nalezeno sedm nových fágů infikující bakterii *Dickeya solani* (Ds3CZ, Ds5CZ, Ds9CZ, Ds16CZ, Ds20CZ, Ds23CZ a Ds25CZ). Genomy jsou u všech fágů dsDNA ve velikosti 1493365-155285 pb. Fág Ds25CZ je velmi podobný fágu LIMEstone 1 a řadí se jako nový virus rodu Limestonevirus. Ostatní fágy jsou izoláty fága Ds25CZ.

Morfologicky mají všechny Dickeya fágy hlavičku a krček. Na fotce 2 je zobrazen fág Ds25CZ.

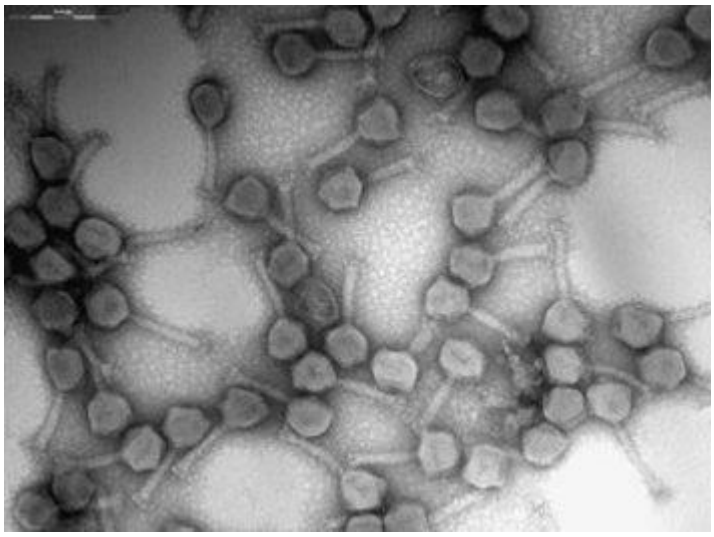
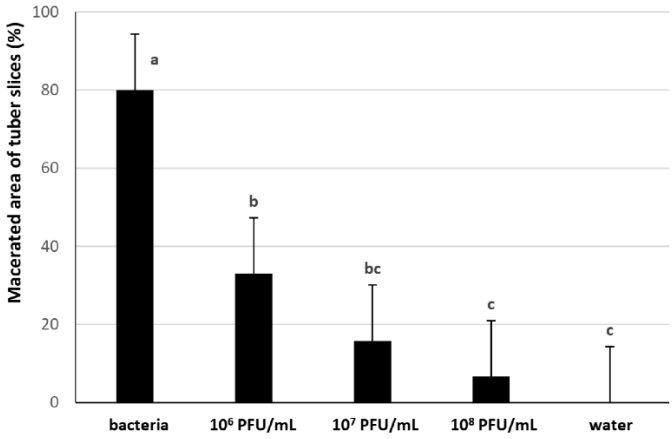


Foto 2 Elektronová mikroskopie fága Ds25CZ

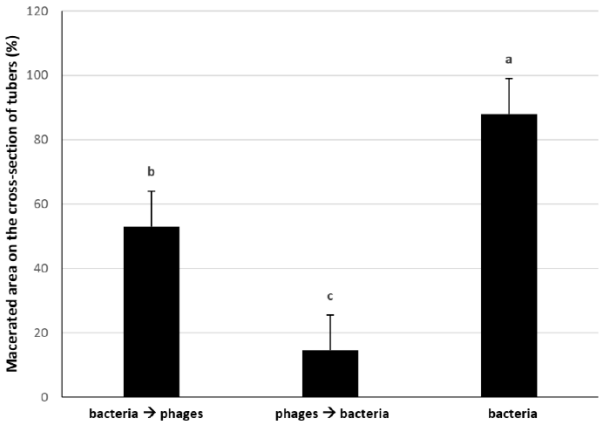
Analýza jejich genomu ukázala největší variabilitu v přítomnosti nebo absenci homing endonukleáz (HE) v genomech. He jsou rozprostřeny po celém genomu a způsobují zlomy v DNA, která umožňuje specifickou změnu genů. 21 HE bylo nalezeno u fágů Ds3CZ, Ds5CZ a Ds20CZ, 20 HE u Ds9CZ, 18 HE u Ds16CZ, 17 HE u Ds25CZ a 14 HE u Ds23CZ.

Hlízy byly ošetřeny fágový koktejlem Ds3CZ a Ds20CZ. Na ošetřených variantách hlíz brambor byla zjištěna statisticky průkazně nižší infekce bakterií *D. solani* u všech testovaných odrůd brambor. Aplikace fágů před inokulací bakteriálním patogenem vedla ke snížení vývoje symptomů choroby v průměru o 47,5 % (foto 3). Dále u těchto fágů byl testována různá koncentrace a její vliv na eliminaci bakteriální kultury (graf 1). Z výsledků vyplývá, že čím byla vyšší počáteční koncentrace fágů, tím vyšší byl pokles bakteriální kultury, dále také, že ošetření hlíz fágem před efektivnější než aplikace fága po napadení bakterií (graf 2).

Foto 3 Neošetřené a ošetřené hlízy brambor fágy Ds3CZ a Ds20CZ (Převzato z publikace č. 5)



Graf 1 Efekt koncentrace různých koncentrací fágového koktejlu (Převzato z publikace č. 6)



Graf 2 Efekt pořadí aplikace fágového koktejlu (Převzato z publikace č. 6)

Hlízy s různým stupněm inokulace bakteriální infekce byly zasazeny na pole a byl sledován růst rostlin. V tomto testu se opět potvrdilo, že pokud je fág aplikován před rozvinutím bakteriální infekce jeho ochrana je vyšší než v opačné případě. V případě aplikace fágů před zasazením hlíz brambor je z ekonomického hlediska mnohem výhodnější preventivní aplikace fága. Aplikace fága při projevech onemocnění má také svůj smysl a dojde ke sníží ekonomických ztrát (foto 4).

Foto 4 Biologická ochrana brambor fágy Ds3CZ a Ds20CZ (Převzato z publikace č. 6)

4.2 Fágy infikující bakterii *Pectobacterium parmentieri*

Fágy PcCB251 a PcCB7V byly izolovány z půdy. Bylo testováno přes 400 vzorků půdy a pouze ve dvou případech byl vzorek pozitivní. To značí, že tyto fágy jsou vzácné. Tyto fágy produkují malé plaky o průměru 1 mm.

Fág PcCB251 obsahuje terminální 192 nt dlouho sekvenci s opakujícím se motivem CCCCC(C)TATGGCCTCCTT, dále obsahuje tři homing endonukleázy. Tento fág specificky infikuje bakterii *P. parmentieri*.

Fág PcCB7V kóduje 13 tRNA genů, deset homing endonukleáz a jednu nukleázu podobnou intronu. Hostitelské bakterie jsou *P. atrosepticum*, *P. maceratum* a *P. parmentieri*.

4.3 Fágy infikující bakterii *Kosakonia cowanii*

Bylo detekováno šest nových fágů infikujících rostlinné kmeny bakterie *K. cowanii* a tři nové fágy infikující humánní kmeny této bakterie (foto 5). Pouze fág Kc166A tvoří velké plaky o průměru 4 mm, ostatní fágy mají plaky ve velikosti 1 mm.

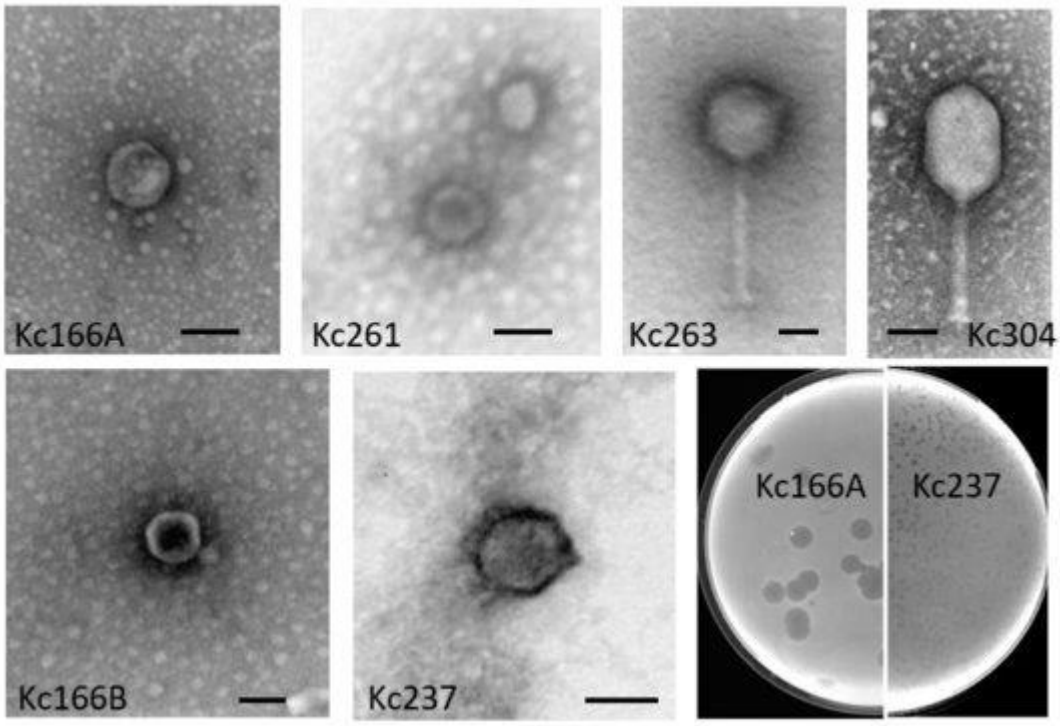


Foto 5 Morfologie a plaky fágů infikujících bakterii *K. cowanii* (Převzato z publikace č. 2)

Specificita fágů byla testována na devíti rostlinných kmenech bakterie *K. cowanii* a na dvou humánních kmenech. Jediný fág Kc263 byl schopen infikovat všechny tyto kmeny. Fágy Kc261 a Kc305 infikovaly pouze jeden kmen bakterie. Fágy Kc166A, Kc166B, Kc237 a Kc261 napadaly jen rostlinné kmeny, zatímco Kc263, Kc283, Kc304 a Kc318 infikovaly jak rostlinné, tak humánní kmeny (tabulka 3).

	K. cowanii										
	039	042	045	048	051	056	059	062	063	18146	Hamburk
	rostlinné kmeny									humánní kmeny	
Kc166A	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Kc261	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kc318	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Kc166B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Kc237	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Kc283	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Kc263	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kc304	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Kc305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabulka 3 Hostitelské spektrum fágů infikujících bakterii *K. cowanii* (Převzato z publikace č. 2)

4.4 Fág M29 infikující bakterii *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Bakteriofág M29 byl izolován z infikovaných listů zelí. Fág M29 tvoří 2 mm velké plaky (foto 6) a řadí se mezi fágy s kontraktilním krčkem (foto 7) a má úzké spektrum hostitelů.

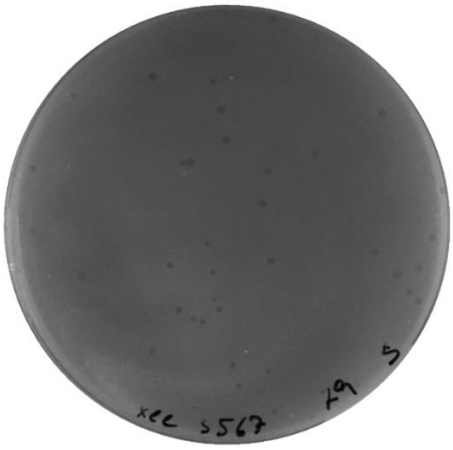


Foto 6 Velkost plaků fága M29

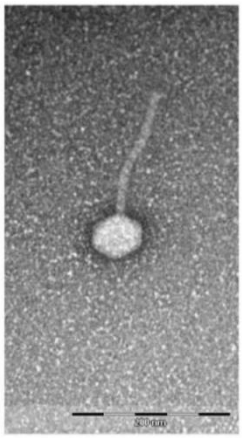
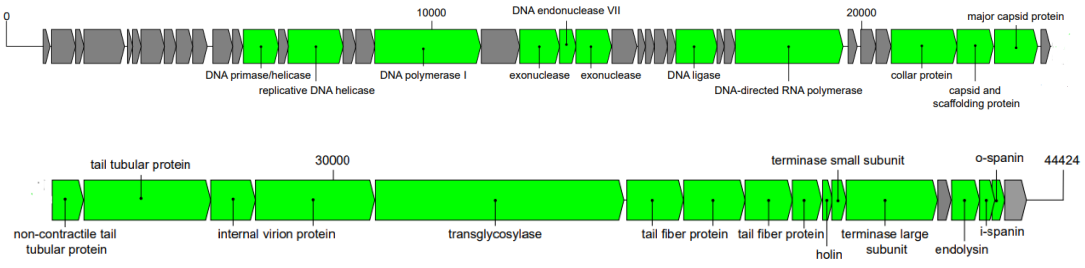


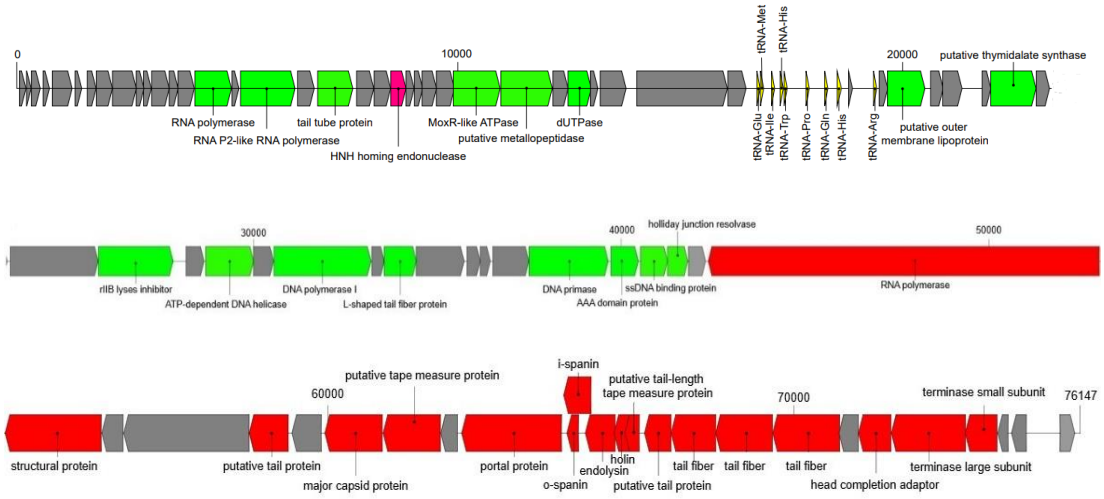
Foto 7 Morfologie fága M29 (Převzato z publikace č. 7)

4.5 Fágy Xe_NED111 a Xe_PB119 infikující bakterii *Xanthomonas euvesicatoria*

Fágy byly izolovány z půdy, kde byla pěstována rajčata. Organizace genomu fágů je zobrazena na obrázcích 1 a 2. Šedě jsou označeny geny, u kterých není známá funkce, zeleně jsou označeny geny na kódujícím vlákně, červeně na nekódujícím vlákně, žlutě geny pro tRNA a růžově homing endonukleázy. Fág Xe_NED111 nekóduje žádnou tRNA, zatímco fág Xe_PB119 jich kóduje devět.

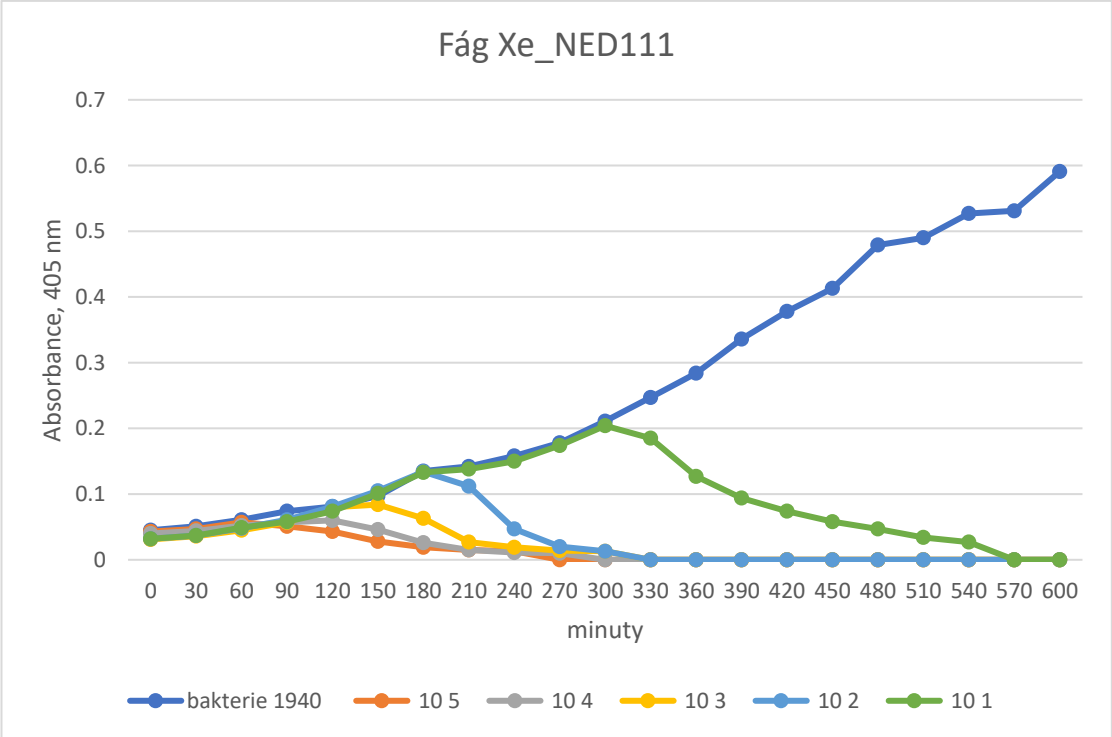


Obr. 1 Organizace genomu fága Xe_NED111

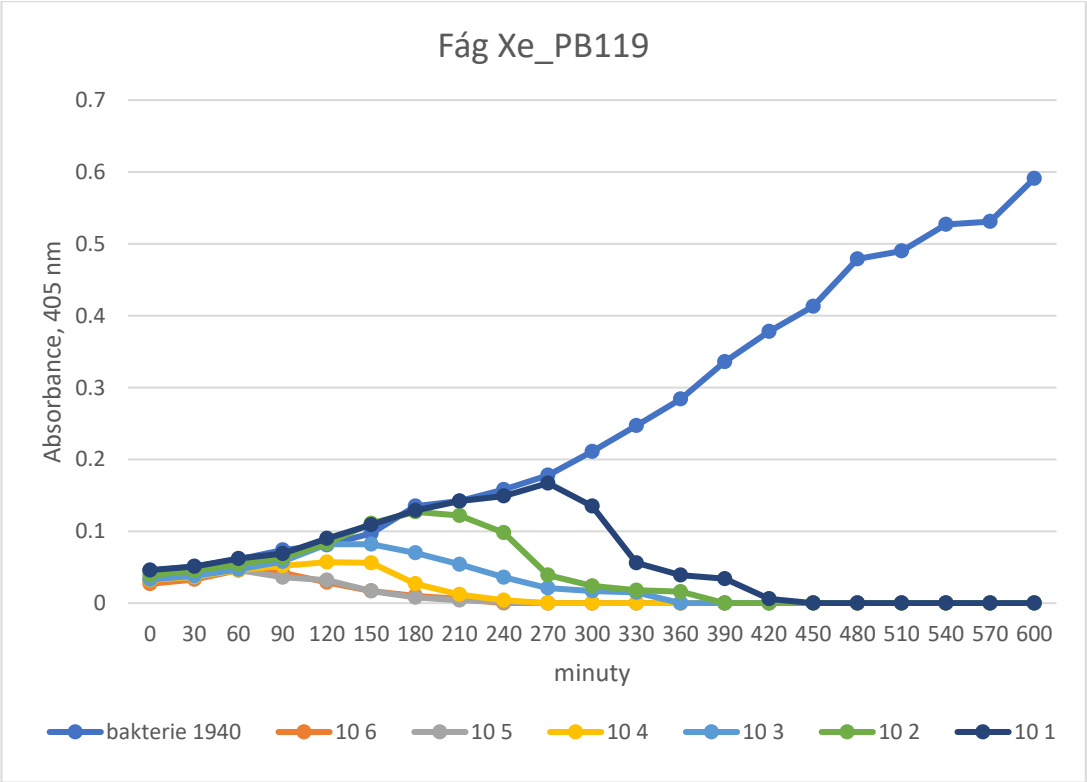


Obr. 2 Organizace genomu fága Xe_PB119

Kinetika růstu byla u fága Xe_NED111 testována v koncentracích $10^{1\text{-}5}$ PFU/µl. Při koncentraci 10^5 začal pokles nárůstu bakteriální kultury kolem 90. minuty. Účinnost fága při nižších koncentracích je pomalejší, ale i tak dojde k celkové lyzi hostitelské bakterie (graf 3) To stejné platí u fága Xe_PB119. Při koncentraci 10^6 PFU/µl začal pokles u 60. minuty (graf 4).



Graf 3 Kinetika růstu fága Xe_NED111



Graf 4 Kinetika růstu fága Xe_PB119

4.5.1 Skladování bakteriofágů

Detekce a kultivace fágů probíhala na Petriho miskách v měkkém agaru při pokojové teplotě po dobu 16 h. Výsledkem byl plak v bakteriálním nárůstu značící přítomnost fága v izolátu. Oba fágy jsou schopné přežít při teplotě 7 °C a infikovat znovu svého hostitele (foto 8, 9).

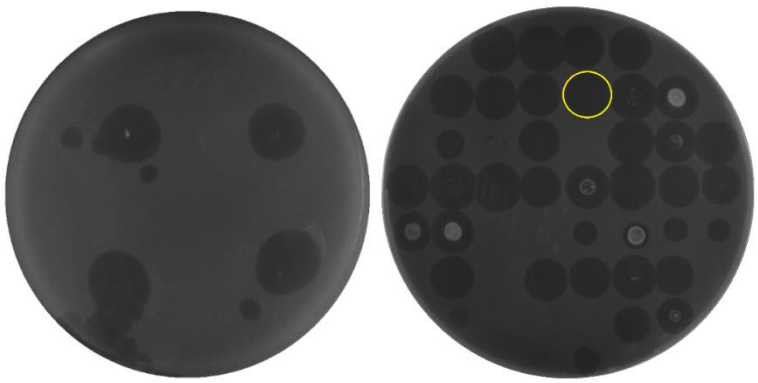


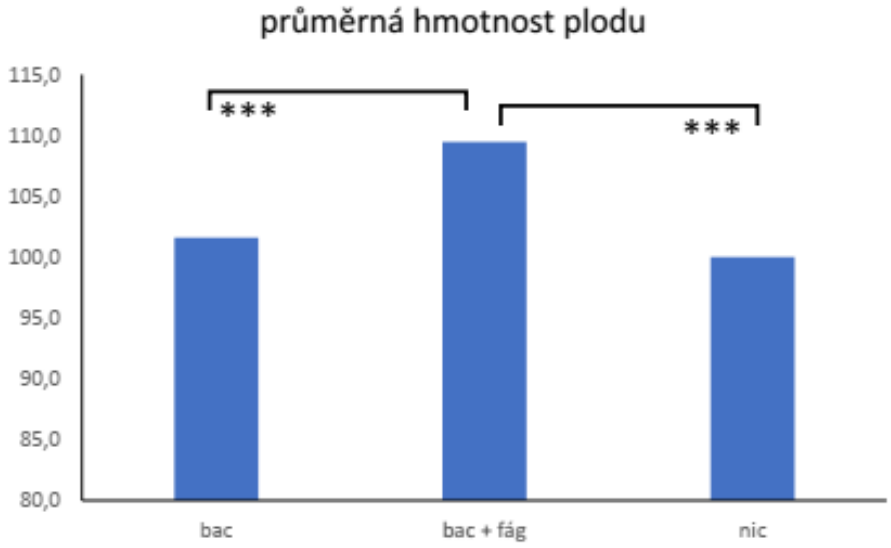
Foto 8 Detekce fága Xe_NED111 rok 2019 a rok 2022

Foto 9 Detekce fága Xe_PB119 rok 2019 a rok 2022

4.5.2 Biologická ochrana rajčat fágem Xe_PB119

Celkem bylo z pokusné výsadby sklizeno 2129 kusů plodů o průměrné hmotnosti 15,37 g.

Z rostlin infikovaných bakterií se sklidilo nejméně plodů o průměrné hmotnosti 15,77 g/kus. Z infikovaných rostlin současně ošetřených roztokem bakteriofága se sklidily plody o průměrné hmotnosti 16,50 g a z rostlin bez jakékoli manipulace se sklidily plody o průměrné hmotnosti 16,20 g. Rozdíly v průměrné hmotnosti plodů mezi infikovanými rostlinami a rostlinami ošetřenými fágem nebo rostlinami bez pokusného zásahu byly statisticky významné na úrovni 95 %, rozdíly mezi rostlinami ošetřenými fágem a rostlinami bez pokusného zásahu nebyly statisticky významné. Z fenologického hlediska jsme pozorovali opožděné zrání plodů u rostlin s bakteriální infekcí a současně nižší výnos z těchto rostlin (graf 5).



Graf 5 Statistické vyhodnocení hmotnosti plodu

4.5.3 Detekce lytických proteinů

K detekci každého proteinu bylo použito 5 µl. Vzorky se vrstvily nakapáním na membránu po 1 µl. Byly testovány obě formy izolace proteinů. U všech proteinů byla úspěšně iniciována exprese a detekována přítomnost proteinů na membráně (foto 10).

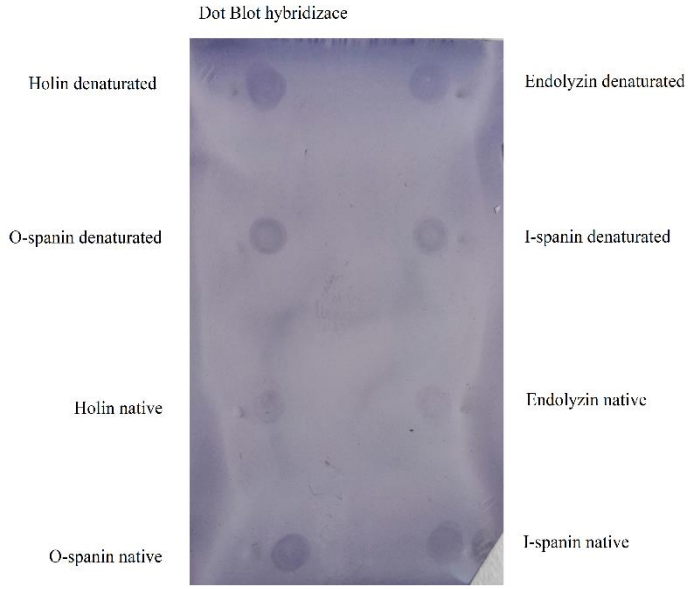
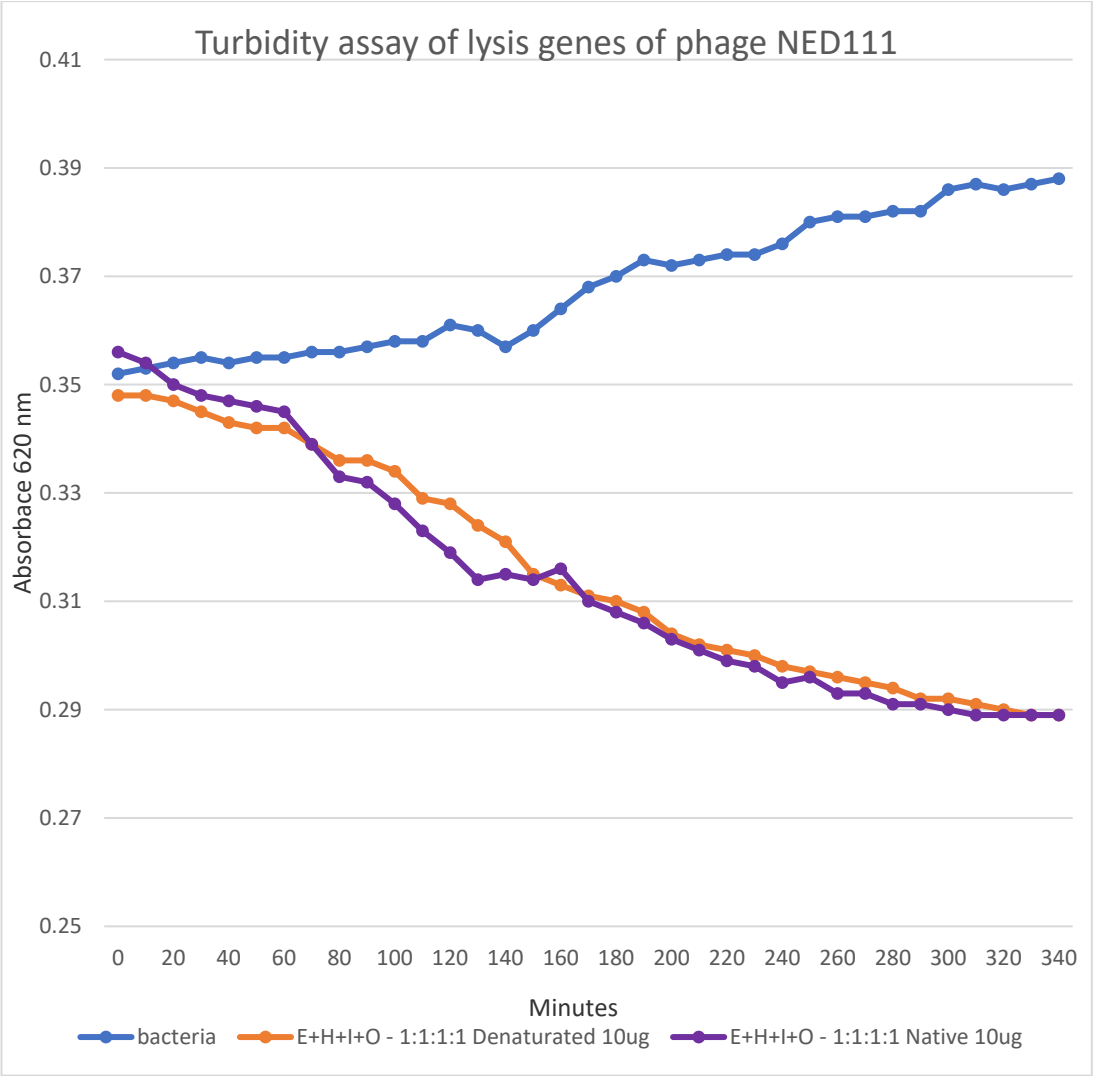


Foto 10 Dot blot hybridizace proteinů fága Xe_NED111

Testování proteinů ukázalo, že pokles bakteriální kultury probíhá pouze v přítomnosti všech čtyřech proteinů o koncentraci 10 µg a molárním poměru 1:1:1:1 v nativní i denaturované formě. Při nižší koncentraci proteinů či jiných poměrech a koncentracích lyze nebyla pozorována naopak pozorujeme další růst kultury. Prakticky okamžitě po smíchání všech lytických proteinů s kulturou hostitelské bakterie následoval její pokles (graf 6).



Graf 6 Aktivita lytických proteinů fága Xe_NED111

Hostitelské spektrum bylo porovnáváno s fágem Xe_NED111 ze kterého byly proteiny izolované. Hostitelské spektrum je jak pro lytické enzymy, tak pro fága stejné (tabulka 4).

Název bakterie	Izolát	Lytické proteiny	Xe_NED111
X. euvesicatoria	1940	+	+
	3a	+	+
X. vesicatoria	1008	+	+
	2044	-	-
X. campestris pv. *campestris*	3291	-	-
	2857	-	-
Pseudomonas syringae	2857	-	-
C. mich. subsp. *mich.*	1460	-	-

Tabulka 4 Hostitelské spektrum lytických proteinů a fága Xe_NED111

5 Závěr

V rámci této disertační práce byly splněny všechny vytyčené cíle:

- V letech 2019–2022 bylo nasbíráno více jak 1000 vzorků půdy, vody, rostlin a kompostů
- Celkem bylo popsáno nových bakteriofágů
    - sedm fágů infikujících bakterii *D. solani*
    - dva fágy infikujících bakterii *P. parmentieri*
    - jeden fág infikující bakterii *X. campestris* pv. *campestris*
    - dva fágy infikujících bakterii *X. euvesicatoria*
    - devět fágů infikujících bakterii *K. cowanii*
- U fágů byla získána jejich genomová sekvence a uložena v databázi GenBank
- Byla zjištěna základní charakteristika fágů, například latentní perioda, fágový výnos či hostitelské spektrum
- Byly amplifikovány lytické geny fága Xe_NED111 a byl úspěšně otestován antimikrobiální účinek těchto genů

Zároveň v této práci byly potvrzeny stanovené hypotézy:

- U většiny bakterií se podařilo najít fágy rychle, u bakterii *P. parmentieri* byla detekce fágů obtížnější, ale také se podařila
- Z laboratorních i polních testů bylo prokázáno, že jsou fágy schopné ochránit rostliny i např. hlízy brambor, a tak snížit ztrátu způsobené při pěstování rostlin i při skladování
- Využitelnost fágů je efektivnější jako prevence, funguje také jako léčba bakteriálního onemocnění, v obou případech dochází ke snížení ekonomických ztát v případě použití fágů

6 Seznam použité literatury

Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., Khan, F. M., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S., & El-Shibiny, A. (2021). Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 1–31. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10020124

Abedon, S. T. (2008). Bacteriophage Ecology. In *Bacteriophage Ecology*. Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/cbo9780511541483

Abera, G., Ibrahim, A. M., Forsido, S. F., & Kuyu, C. G. (2020). Assessment on post-harvest losses of tomato (Lycopersicon esculentem Mill.) in selected districts of East Shewa Zone of Ethiopia using a commodity system analysis methodology. *Heliyon*, *6*(4), e03749. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E03749

Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, *154*(4), 245–251. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6

Berry, J., Rajaure, M., Pang, T., & Young, R. (2012). The spanin complex is essential for lambda lysis. *Journal of Bacteriology*, *194*(20), 5667–5674. https://doi.org/10.1128/JB.01245-12/SUPPL_FILE/ZJB999092028SO1.PDF

Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN, p. 34). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034

Cahill, J., & Young, R. (2019). Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Advances in Virus Research*, *103*, 33–70. https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2018.09.003

Chernyshov, S. V., Masulis, I. S., & Mikoulinskaia, G. V. (2024). From DNA to lytic proteins: transcription and translation of the bacteriophage T5 holin/endolysin operon. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *40*(8). https://doi.org/10.1007/S11274-024-04063-2

Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*(1), 31. https://doi.org/10.4161/BACT.1.1.14942

Cook, R., Brown, N., Redgwell, T., Rihtman, B., Barnes, M., Clokie, M., Stekel, D. J., Hobman, J., Jones, M. A., & Millard, A. (2021). INfrastructure for a PHAge REference Database: Identification of large-scale biases in the current collection of phage genomes. *BioRxiv*, 2021.05.01.442102. https://doi.org/10.1101/2021.05.01.442102

D'accolti, M., Soffritti, I., Mazzacane, S., & Caselli, E. (2021). Bacteriophages as a Potential 360-Degree Pathogen Control Strategy. *Microorganisms*, *9*(2), 1–15. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020261

Dams, D., & Briers, Y. (2019). Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1148*, 233–253. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_11

Fathima, B., & Archer, A. C. (2021). Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissant weapon. *Research in Microbiology*, *172*(6), 103863. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2021.103863

Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(10), 641–650. https://doi.org/10.1038/nrmicro3527

Finney, A. G., Perry, J. M., Evans, D. R., Westbrook, K. J., McElheny, C. L., Iovleva, A., Doi, Y., Shields, R. K., & Van Tyne, D. (2022). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Targeting Diverse Enterobacter spp. Clinical Isolates. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, *3*(1), 50–58. https://doi.org/10.1089/PHAGE.2021.0011

Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/326452

Frampton, R. A., Taylor, C., Holguín Moreno, A. V., Visnovsky, S. B., Petty, N. K., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2014). Identification of Bacteriophages for Biocontrol of the Kiwifruit Canker Phytopathogen Pseudomonas syringae pv. actinidiae. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(7), 2216. https://doi.org/10.1128/AEM.00062-14

Hibstu, Z., Belew, H., Akelew, Y., & Mengist, H. M. (2022). Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections. *Biologics: Targets and Therapy*, *16*, 173–186. https://doi.org/10.2147/BTT.S381237

Holtappels, D., Fortuna, K. J., Moons, L., Broeckaert, N., Bäcker, L. E., Venneman, S., Rombouts, S., Lippens, L., Baeyen, S., Pollet, S., Noben, J. P., Oechslin, F., Vallino, M., Aertsen, A., Maes, M., Van Vaerenbergh, J., Lavigne, R., & Wagemans, J. (2022). The potential of bacteriophages to control Xanthomonas campestris pv. campestris at different stages of disease development. *Microbial Biotechnology*, *15*(6), 1762–1782. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14004

Ioannou, P., Baliou, S., & Samonis, G. (2023). Bacteriophages in Infectious Diseases and Beyond-A Narrative Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *12*(6). https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12061012

Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1704–1711. https://doi.org/10.1128/AEM.02118-06

Jurczak-Kurek, A., Gasior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Narajczyk, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wróbel, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/srep34338

Kilcher, S., & Loessner, M. J. (2019). Engineering Bacteriophages as Versatile Biologics. *Trends in Microbiology*, *27*(4), 355–367. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.09.006

Kizheva, Y., Eftimova, M., Rangelov, R., Micheva, N., Urshev, Z., Rasheva, I., & Hristova, P. (2021). Broad host range bacteriophages found in rhizosphere soil of a healthy tomato plant in Bulgaria. *Heliyon*, *7*(5). https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07084

Kongari, R., Snowden, J., Berry, J. D., & Young, R. (2018). Localization and Regulation of the T1 Unimolecular Spanin. *Journal of Virology*, *92*(22). https://doi.org/10.1128/jvi.00380-18

Kovalskaya, N., Foster-Frey, J., Donovan, D. M., Bauchan, G., & Hammond, R. W. (2016). Antimicrobial Activity of Bacteriophage Endolysin Produced in Nicotiana benthamiana Plants. *J. Microbiol. Biotechnol. J. Microbiol. Biotechnol*, *26*(1), 160–170. https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05060

Kurtböke, D. I., & Kurtböke, D. I. (2012). A Phage-Guided Route to Discovery of Bioactive Rare Actinomycetes. *Bacteriophages*. https://doi.org/10.5772/33923

Kyeon, M. S., Son, S. H., Noh, Y. H., Kim, Y. E., Lee, H. I., & Cha, J. S. (2016). Xanthomonas euvesicatoria causes bacterial spot disease on pepper plant in Korea. *Plant Pathology Journal*, *32*(5), 431–440. https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2016.0016

Liu, J., Chia, S. L., & Tan, G. H. (2021). Isolation and characterization of novel phages targeting xanthomonas oryzae: Culprit of bacterial leaf blight disease in rice. *PHAGE:*

Therapy, Applications, and Research, *2*(3), 142–151. https://doi.org/10.1089/PHAGE.2021.0009

Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, *1*(2), 111–114. https://doi.org/10.4161/BACT.1.2.14590

Marcelli, B., Karsens, H., Nijland, M., Oudshoorn, R., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2020). Employing lytic phage-mediated horizontal gene transfer in Lactococcus lactis. *PLoS ONE*, *15*(9 september), e0238988. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238988

Mc Grath, S., & van Sinderen, D. (2007). *BACTERIOPHAGE : genetics and molecular biology*. CAISTER ACADEMIC Press.

Mohan Raj, J. R., Ajakkala, P. B., Krishna Kumar, B., Deekshit, V. K., & Rai, P. (2022). Phage therapy: A promising approach to counter antimicrobial drug resistance. In *Biotechnology in Healthcare, Volume 1: Technologies and Innovations* (Vol. 1). INC. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89837-9.00004-8

Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*, *13*(4). https://doi.org/10.3390/V13040680

Olsen, N. S., Hendriksen, N. B., Hansen, L. H., & Kot, W. (2020). A New High-Throughput Screening Method for Phages: Enabling Crude Isolation and Fast Identification of Diverse Phages with Therapeutic Potential. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, *1*(3), 137–148. https://doi.org/10.1089/PHAGE.2020.0016/ASSET/IMAGES/LARGE/PHAGE.2020.0016_FIGURE3.JPEG

Papaianni, M., Paris, D., Woo, S. L., Fulgione, A., Rigano, M. M., Parrilli, E., Tutino, M. L., Marra, R., Manganiello, G., Casillo, A., Limone, A., Zoina, A., Motta, A., Lorito, M., & Capparelli, R. (2020). Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After Xanthomonas campestris pv. campestris Infection. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 732. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00732

Pires, D. P., Costa, A. R., Pinto, G., Meneses, L., & Azeredo, J. (2020). Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(6), 684–700. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017

Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(MAY), 1–9. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513

Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., & Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *NPJ Science of Food*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/S41538-023-00245-8

Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., & De Paepe, M. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunology 2020 13:2*, *13*(2), 205–215. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5

Sieiro, C., Areal-hermida, L., Pichardo-gallardo, Á., Almuiña-gonzález, R., de Miguel, T., Sánchez, S., Sánchez-pérez, Á., & Villa, T. G. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture? *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(8), 1–30. https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9080493

Sisson, H. M., Jackson, S. A., Fagerlund, R. D., Warring, S. L., & Fineran, P. C. (2024). Gram-negative endolysins: overcoming the outer membrane obstacle. *Current Opinion in Microbiology*, *78*. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2024.102433

Soontarach, R., Srimanote, P., Arechanajan, B., Nakkaew, A., Voravuthikunchai, S. P., & Chusri, S. (2024). Characterization of a novel bacteriophage endolysin (LysAB1245) with extended lytic activity against distinct capsular types associated with Acinetobacter baumannii resistance. *PloS One*, *19*(1). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0296453

Stefani, E., Obradović, A., Gašić, K., Altin, I., Nagy, I. K., & Kovács, T. (2021). Bacteriophage-mediated control of phytopathogenic xanthomonads: A promising green solution for the future. *Microorganisms*, *9*(5), 1–21. https://doi.org/10.3390/microorganisms9051056

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(3), 649–659. https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

Trofimova, E., & Jaschke, P. R. (2021). Plaque Size Tool: An automated plaque analysis tool for simplifying and standardising bacteriophage plaque morphology measurements. *Virology*, *561*, 1–5. https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2021.05.011

Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses 2021, Vol. 13, Page 506*, *13*(3), 506. https://doi.org/10.3390/V13030506

Vinod Kumar, C. S., Makari, H. K., Srinivasa, H., Basavarajappa, K. G., & Kalsurmath, S. (n.d.). Bacteriophage Therapy: A Potential Use of Phages in Medical Field. *Research & Reviews in BioSciences*, *3*(1). Retrieved February 27, 2023, from https://www.tsijournals.com/abstract/bacteriophage-therapy-a-potential-use-of-phages-in-medical-field-3936.html

Vu, N. T., & Oh, C. S. (2020). Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants. *Plant Pathology Journal*, *36*(3), 204–217. https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.04.2020.0074

Weber-Dabrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Zaczek, M., Łobocka, M., Łusiak-Szelachowska, M., & Górski, A. (2016). Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG), 1177. https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01177/BIBTEX

Young, R. (2014). Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology*, *52*(3), 243–258. https://doi.org/10.1007/S12275-014-4087-Z/METRICS

Zampara, A., Sørensen, M. C. H., Grimon, D., Antenucci, F., Vitt, A. R., Bortolaia, V., Briers, Y., & Brøndsted, L. (2020). Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. *Scientific Reports*, *10*(1), 12087. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68983-3

7 Životopis

Vzdělání

2008 – 2012 Střední odborná škola veterinární, mechanizační a zahradnická a jazyková škola, České Budějovice, obor Veterinární prevence

2012 – 2017 Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Bakalářské studium oboru Zemědělské biotechnologie

2017 – 2019 Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Navazující magisterské studium oboru Zemědělské biotechnologie

2019 - současnost Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Doktorské studium oboru Zemědělské biotechnologie

Pracovní zkušenosti

září 2016 – prosinec 2018 BBH Tsuchiya s.r.o., chemik – laborant

leden 2019 – současnost Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin, technik v biologii

Stáže

12.7. - 30.7. 2021 Mendelova univerzita – Zahradnická fakulta – Ústav genetiky Lednice

15.11.2021-15.5.2022 INRAe - Plant Virus team of UMR 1332 BFP – Francie, Bordeaux

8 Seznam publikovaných prací

Kmoch M., Petrzik K., Brázdová S., Kopačka V., Vacek J., Ševčík R. (2020). Využití bakteriofágů při ochraně bramboru proti bakteriím rodu Dickeya. *Úroda* 68(12): 187-191.

Kmoch M., Binderová D., Kopačka V., Vacek J., Brázdová S., Petrzik K., Ševčík R. (2020). Metodika diagnostiky bakterií *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani* pomocí real-time PCR. Certifikovaná metodika (osvědčení UKZUZ 217957/2020). Vydání první. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. 27 s. ISBN: 978-80-86940-90-8.

Petrzik K., Vacek J., Brázdová S., Ševčík R., Koloniuk I. (2021). Diversity of limestone bacteriophages infecting Dickeya solani isolated in the Czech Republic. *Archives of Virology* 166 (4): 1171-1175. DOI: 10.1007/s00705-020-04926-7

Petrzik K., Kmoch M., Brázdová S., Ševčík R. (2021). Complete genome sequences of novel Berlinvirus and novel Certrevirus lytic for Pectobacterium sp. causing soft rot and black leg disease of Potato. *Virus Genes* 57 (3): 302-305. DOI: 10.1007/s11262-021-01838-9

Petrzik K., Brázdová S., Krawczyk K. (2021). Novel Viruses That Lyse Plant and Human Strains of *Kosakonia cowanii*. *Viruses* 13 (8): 1418. DOI: 10.3390/v13081418

Koloniuk I., Matyášová A., Brázdová S., Veselá J., Přibylová J., Fránová J., Santiago F.E. (2022) Transmission of Diverse Variants of Strawberry Viruses Is Governed by a Vector Species Viruses 14(7): 1362.DOI: 10.3390/v14071362

Schönegger D., Marais A., Babalola B.M., Faure C., Lefebvre M., Svanella-Dumas L., Brázdová S., Candresse T. (2023). Carrot populations in France and Spain host a complex virome rich in previously uncharacterized viruses. *PLoS ONE* 18 (8): e0290108.DOI: 10.1371/journal.pone.0290108

Petrzik K., Vacek J., Kmoch M., Binderová D., Brázdová S., Lenz O., Ševčík R. (2023). Field Use of Protective Bacteriophages against Pectinolytic Bacteria of Potato. *Microorganisms* 11: 620. DOI: 10.3390/microorganisms11030620

Petrzik K., Brázdová S. (2023). Jojan: a novel virus that lyses Stenotrophomonas maltophilia from dog. *Virus Genes* 59: 775-780. DOI: 10.1007/s11262-023-02021-y

Neoralová M., Brázdová S., Eichmeier A., Petrzik K. (2023). Complete genome sequence of Xanthomonas phage M29, a new member of Foxunavirus isolated in the Czech Republic. *Virus Genes* 59:874–877. DOI: 10.1007/s11262-023-02027-6

Koloniuk I., Matyášová A., Brázdová S., Veselá J., Přibylová J., Várallyay E., Várallyay E., Fránová J. (2023). Analysis of Virus-Derived siRNAs in Strawberry Plants Co-Infected with Multiple Viruses and Their Genotypes. *Plants* 12(13): 2564. DOI: 10.3390/plants12132564

Petrzik K., Brázdová S. (2024). PATENT: Kmen bakteriofága Xe_PB119, přípravek na bázi tohoto kmene bakteriofága a jejich použití proti onemocnění bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky Úřad průmyslového vlastnictví patent č. 309961: PV 2022-397.

Petrzik K., Brázdová S. (2024). PATENT: Kmen bakteriofága Xe_NED111, přípravek na bázi tohoto kmene bakteriofága a jejich použití proti onemocnění bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky Úřad průmyslového vlastnictví patent č. 309960: PV 2022-395.