

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Zemědělská fakulta**

**Katedra rostlinné výroby**

**Detekce fytoplazem pomocí PCR amplifikace vybraných fragmentů  
fytoplazmového genomu**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Jaroslava Marková**

**Zemědělské biotechnologie**

Vedoucí práce

**Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.**

Konzultant

**prof. ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**České Budějovice, duben 2011**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma Detekce fytoplazem pomocí PCR amplifikace vybraných fragmentů fytoplazmového genomu vypracovala samostatně pouze s použitím vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 15.4.2011

Jaroslava Marková

Děkuji především svému vedoucímu práce Mgr. Ondrovi Lenzovi, PhD. a konzultantovi prof. Ing Vladislavu Čurnovi, PhD. za metodické a odborné vedení, neocenitelnou pomoc a připomínky k vlastnímu řešení práce a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Výzkum byl umožněn díky podpoře z grantu Grantové agentury ČR, číslo GP 522/09/P545

Jaroslava Marková

## SOUHRN

Fytoplazmy jsou bakteriálními patogeny rostlin. Mohou způsobit zničující ztráty výnosu u různých plodin. Pro rychlé odhalení fytoplazmových nákaz je potřeba nalézt spolehlivou detekční techniku. Nejsnazší a nejlevnější technikou je právě PCR (polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce), která slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA. Cílem této práce bylo nalezení optimálních primerů k amplifikaci vybraných fragmentů fytoplazmového genomu v jedнокrokové PCR a využití této techniky k detekci fytoplazem. Pro tuto studii bylo použito 37 vzorků fytoplazem ze sbírky od prof. Bertaccini. Pomocí optimalizovaných primerů bylo testováno 16 přírodních vzorků. Fytoplazmu se podařilo detekovat v kořenu jahodníku. Výzkum byl umožněn díky podpoře z grantu Grantové agentury ČR, číslo GP 522/09/P545.

Klíčová slova: fytoplazma; polymerázová řetězová reakce; primer; optimální podmínky; citlivost detekce; specificita detekce

## SUMMARY

Phytoplasmas are bacterial pathogens of plants. They can cause devastating losses of yield of diverse crops. It is necessary to find reliable detection technique for detection of phytoplasmas disease. The easiest and the cheapest technique is just PCR (polymerase chain reaction) which is used to selective amplification of selected parts of the molecule DNA. The aim of this bachelor thesis is to find of optimal primers to amplification of selected fragments of phytoplasmas genome in one-step PCR and use this technique in detection of phytoplasmas. A collection of phytoplasmas from professor Bertaccini with 37 samples was used for this study. It was tested 16 natural samples by optimized primers. Phytoplasma was detected in strawberry root. Research was supported by the Czech Science Foundation, Grant No. GP 522/09/P545.

Keywords: phytoplasma; polymerase chain reaction; primer; optimal conditions; detection sensitivity; detection specificity

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
2.1 PŘÍZNAKY.....	9
2.2 NĚKTERÉ TYPICKÉ CHOROBY ZPŮSOBENÉ FYTOPLAZMAMI.....	11
2.3 HOSTITELÉ A PŘENAŠEČI.....	12
2.4 GENOM.....	12
2.5 METODY DETEKCE FYTOPLAZMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	13
2.5.1 VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ.....	14
2.5.2 MIKROSKOPICKÁ HODNOCENÍ.....	14
2.5.3 SÉROLOGICKÉ METODY.....	16
2.5.4 MOLEKULÁRNÍ METODY.....	18
<b>3. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>27</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>28</b>
4.1. VZORKY.....	28
4.2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	30
4.3. PURIFIKACE DNA Z PCR REAKCE.....	33
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>34</b>
5.1 AMPLIFIKACE <i>tuf</i> GENU.....	34
5.2 AMPLIFIKACE <i>secY</i> GENU.....	35
5.3 AMPLIFIKACE <i>rpS3</i> GENU.....	37
5.4 AMPLIFIKACE GENU PRO 16/23S <sub>r</sub> RNA-SPACER.....	39
5.5 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY A PRIMERY PRO DETEKCI FYTOPLAZEM.....	41
5.6 DETEKCE FYTOPLAZEM V PŘÍRODNÍCH VZORCÍCH.....	42
5.7 FYLOGENETICKÁ ANALÝZA.....	43
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>48</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>50</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>51</b>
<b>9. PŘÍLOHY</b> .....	<b>55</b>
9.1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	56

## 1. ÚVOD

Fytoplazmy jsou polymorfní bakterie (Kůdela et al., 2002) bez pevné buněčné stěny, které byly dříve označovány jako organismy podobné mykoplazmám (mycoplasma-like organisms – MLOs). Byly objeveny ve floému rostlin se žloutenkou v roce 1967 (Christensen et al., 2005). Doi *et al.*(1967) pozorovali pomocí elektronového mikroskopu v lýku aster oválné buňky podobné živočišným mykoplazmám. Přísluší do třídy Mollicutes, která zahrnuje malé pleomorfní bakterie s jednoduchými (trojvrstevnými) membránami, které se liší od grampozitivních předků (s největší pravděpodobností *Clostridium* nebo *Lactobacillus* spp.) prostřednictvím genomu a redukcemi či ztrátou buněčné stěny. Třída Mollicutes dále zahrnuje mykoplazmy, ureaplazmy, spiroplazmy a acholeplazmy. Fytoplazmy tvoří monofyletickou skupinu, která vznikla z větve *Acholeplasma*, a která je evolučně vzdálená od ostatních větví (Hogenhout et al., 2008).

Fytoplazmy jsou bakteriálními patogeny rostlin (~ 500 nm v průměru), které mohou po celém světě způsobit ničující ztráty výnosu u různých plodin (Hogenhout et al., 2008). Nová ohniska nákazy, připisována těmto bakteriím, se objevují čas od času v různých geografických regionech (Garcia-Chapa et al., 2004). Znalost jejich biologie je omezená. Jejich specifické životní nároky neumožňují kultivaci *in vitro* (Christensen et al., 2005). Nemohou být rozlišeny a klasifikovány pomocí klasických biofyzikálních a biochemických fenotypových kritérií, která jsou běžně používána pro kultivovatelné mikroorganismy. Pro výzkum a klasifikační účely jsou k dispozici referenční sbírky fytoplazmových kmenů udržované v barvínku (Bertaccini a Duduk, 2009).

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 PŘÍZNAKY

Fytoplazmy jsou spojeny s chorobami několika stovek druhů rostlin, včetně mnoha důležitých potravin, zeleniny a ovocných plodin, okrasných rostlin, dřevin a stinných dřevin. Seznam nemocí způsobených fytoplazmami nadále roste (Bertaccini a Duduk, 2009).

Běžným příznakem způsobeným fytoplazmami je přeměna květů v listy. Důkazy nasvědčují tomu, že fytoplazma stolburu rajčat degeneruje gen zapojený do tvorby květu. Jedním z nejčastějších příznaků je žloutnutí listů, spojené se změnou v syntéze a dopravě sacharidů. Fotosyntéza, hlavně fotosystém II, chlorofyl a karotenoidy spolu s jejich syntézou jsou v mnoha napadených rostlinách potlačeny. Nedávno byla prokázána i indukovaná exprese genů syntázy sacharózy a alkoholdehydrogenázy I v infikovaných rostlinách vinné révy (Bertaccini a Duduk, 2009). Syntáza sacharózy se podílí na metabolismu sacharózy ve floému, včetně jejího zpětného rozkladu na monosacharidy glukózu a fruktózu. Tento gen je pravděpodobně ovlivněn fytoplazmovou infekcí nepřímým způsobem: monosacharidy jsou hlavním zdrojem energie pro fytoplazmy, které postrádají enzymy pro rozklad sacharózy, a proto pravděpodobně využívají syntázy hostitelských rostlin. Alkoholdehydrogenáza I, zapojená do alkoholového kvašení zapříčiní přepnutí metabolismu na fermentaci. (Hren et al., 2009). Fytoplazmy se mohou na napadených rostlinách projevit též rozvojem zelených květů kvůli ztrátě pigmentu v buňkách okvětních lístků. Mnoho rostlin napadených fytoplazmou získají křovinný nebo čarověnickový vzhled díky změnám v růstových zákonitostech. Jedná se především o ztrátu apikální dominance, což způsobuje proliferaci prýtů a snížení délky internodií. Fytoplazmy mohou způsobovat mnoho dalších nespecifických příznaků vyplývajících ze stresových situací, kterým jsou hostitelské rostliny vystaveny (Bertaccini a Duduk, 2009). Výjimkou není ani latentní infekce (Kazda, 2007). Je nutné zdůraznit, že podobné příznaky mohou vyvolat i jiné patogeny a škůdci (viry, roztoči, bakterie, hád'átka), nebo mohou být způsobené i nesprávnou aplikací některých herbicidů (Navrátil, 2009).

V některých případech jsou rostliny infikované fytoplazmou využívány pro komerční účely. Typickým příkladem je tzv. vánoční hvězda (*Euphorbia pulcherrima*). Pokud je infikována fytoplazmou má více květů, které jsou menší, takže může být snadno pěstována v květináčích (Bertaccini a Duduk, 2009). Navíc vypadá lépe než ta samá rostlina s jedním květem.



## 2.2 NĚKTERÉ TYPICKÉ CHOROBY ZPŮSOBENÉ FYTOPLAZMAMI

### **Proliferace jabloně (Apple proliferation phytoplasma ~ AP)**

Choroba je způsobena fytoplazmou „*Candidatus Phytoplasma mali*“, jejímž hlavním hostitelem je právě jabloň domácí (*Malus domestica*). Příznaky jsou velice variabilní, často pouze latentní. Typickým příznakem jsou zvětšené palisty a metlovitost. Infikované stromy často opakovaně kvetou a méně rostou (Navrátil, 2010), dochází i k silné redukci velikosti, hmotnosti (až o 63–74 %) a kvality plodů (Kúdela et al., 2002).

### **Chřadnutí hrušně (Pear decline phytoplasma ~ PD)**

Hlavním hostitelem je hrušeň obecná (*Pyrus communis*). Choroba je způsobena fytoplazmou „*Candidatus Phytoplasma pyri*“. Její průběh je velice variabilní, od rychlého odumření (uschnutí) částí nebo celého stromu až po mírné příznaky kadeřavění nebo předčasného červenaní listů. Rychlé odumření je spojeno s poškozením lýka, listy a plody zastaví růst a rychle vadnou. Mírný průběh choroby je spojen s příznaky malolistosti. Listy jsou světleji zelené, může docházet ke svinování jejich okrajů směrem nahoru, předčasně červenají a opadávají (Navrátil, 2010).

### **Fytoplazma evropské žloutenky peckovin (European stone fruit yellows phytoplasma ~ ESFY)**

Obecně jsou hostitelskými rostlinami rostliny rodu *Prunus*, hlavně meruňka a broskvoň. V současnosti se v ČR běžně vyskytuje na meruňkách, méně pak na broskvonicích. Ojedinele byly nalezeny infikované stromy švestky domácí, třešně a višně (Navrátil, 2009). Choroba je způsobena fytoplazmou „*Candidatus Phytoplasma prunorum*“. Typickým příznakem je chlorotická svinutka listů vyskytující se na jednotlivých infikovaných větvích a rychle se šíří po celé rostlině (Navrátil, 2009). Plody jsou zpravidla menší, předčasně dozrávají a opadávají nebo zasychají na stromě (Kúdela et al., 2002).

### **Stolbur fytoplazma**

Významnými hostitelskými rostlinami jsou brambor (*Solanum tuberosum*), rajče (*Lycopersicon esculentum*), paprika (*Capsicum annuum*), réva vinná (*Vitis vinifera*), rostliny z čeledi *Solanaceae* a další. V ČR je zařazen do seznamu karanténních organismů původce stolburu, *Potato stolbur Phytoplasma*. Choroba se projevuje

při klíčení hlíz nitkovitými klíčky, později větvením stonku, žloutnutím a svinováním listů (Navrátil, 2008).

### 2.3 HOSTITELÉ A PŘENAŠEČI

Fytoplazmy jsou obligátními parazity rostlin a hmyzu. U rostlin setrvávají obvykle ve floémovém pletivu. Šíří se celou rostlinou přes póry sítkovic. (Hogenhout et al., 2008). Mezi jednotlivými rostlinami se běžně šíří vegetativně, a to pomocí roubů, oček a hlíz. Mohou se také šířit pomocí parazitické rostliny, např. kokotice (*Cuscuta* spp.) (Navrátil a Fialová, 2008). Ve většině případů potřebují k šíření v přírodě oba hostitele. Do hmyzích vektorů se dostávají přes stylety, odkud se dostávají přes střeva do hemolymfy. Následně osidlují slinné žlázy. Tento proces může trvat až několik týdnů. Přenos hmyzem je umožněn membránovými bílkovinami fytoplazem (Bertaccini a Duduk, 2009). Hmyz, sající šťávy floému a přenášející fytoplazmy, patří do řádu Hemiptera, který zahrnuje čeleď křísovitých (Cicadellidae), svítilek (Fulgoromorpha) a merovitých (Psyllidae) (Hogenhout et al., 2008). Mechanicky jsou fytoplazmy prakticky nepřenositelné. (Christensen et al., 2005). Fytoplazmy mohou přezimovat v hmyzu nebo v trvalkách.

### 2.4 GENOM

Většina fytoplazmových buněk obsahuje malý genom z jedné kruhové dsDNA (double-stranded DNA; dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina) s nízkým obsahem C + G (Wang et al., 2010). Bylo ale zjištěno, že fytoplazma proliferace jabloně „*Candidatus Phytoplasma mali*“ (Kube et al., 2008), fytoplazma chřadnutí hrušně „*Candidatus Phytoplasma pyri*“ a fytoplazma evropské žloutenky peckovin „*Candidatus Phytoplasma prunorum*“ mají lineární chromozom. Jeho velikost se pohybuje v rozmezí od 530 kb do 1350 kb a kóduje mezi 671 a 1350 genů. Fytoplazmy ale postrádají mnoho genů nezbytných pro buněčný metabolismus, neboť se spoléhají na příjem živin z obou svých hostitelů. Jsou to hlavně ty, pro „de novo“ syntézu aminokyselin, mastných kyselin nebo nukleotidů (Hull, 2009). Fascinující je, že fytoplazmám chybí protein podobný tubulinu, který je nezbytný pro buněčné dělení (Christensen et al., 2005). Fytoplazmy obsahují velké množství transpozónů a inzertních sekvencí, které jsou zodpovědné za variabilitu genomu, která je důležitá pro přežití fytoplazem v různém prostředí rostlin a hmyzu. Tyto sekvence byly označeny jako variabilní struktury (SVM – sequence-variable mosaics) a potenciální mobilní jednotky (PMU – potential mobile units). Také

obsahují unikátní opakující se rodinný palindrom (REP – repetitive extragenic palindromes) s názvem PhREPS. Jeho funkce je neznámá, ale může hrát roli v ukončování transkripce nebo stabilitě genomu. Fytoplazmy obsahují mimochromozomální DNA – plazmidy. Tyto krátké kruhové DNA (1,7 až 7,4 kb) byly zjištěny u všech členů skupin žloutenky aster (16SrI) a stolburu (16SrXII) a některých členů X skupiny fytoplazmového onemocnění (16SrIII) a proliferace jetele 16SrVI). Některé malé plazmidy mohou být virového původu, z nichž některé mají sekvenční podobnost s geny geminivirů rostlin (Bertaccini a Duduk, 2009).

Z fylogenetických studií vyplývá, že společným předkem fytoplazem je *Acholeplasma laidlawii*, která kóduje aminokyselinu tryptofan pomocí UGG. Ostatní prokaryota (mykoplasma a spiroplasma) kódují tryptofan pomocí UGA, přičemž fytoplazmy používají UGA jako stop kodon (Bertaccini a Duduk, 2009).

Do současné doby byly kompletně sekvenovány čtyři fytoplazmové genomy. Jedná se o kmeny Onion Yellows M a Aster yellows witches'-broom patřící do ribozomální podskupiny 16SrI-B a I-A, dále pak kmeny „*Candidatus Phytoplasma austariense*“ (podskupina tuf-Australia; rp-A) a „*Candidatus Phytoplasma mali*“. K určitým potížím v sekvenování vedla kontaminace hostitelskou DNA, společně s faktem, že fytoplazmová DNA je bohatá na A+T v častých repetičích (Weintraub a Jones, 2010).

## 2.5 METODY DETEKCE FYTOPLAZMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Množství fytoplazem v nadzemních částech rostlin kolísá v závislosti na ročním období a průběhu klimatických podmínek v jednotlivých letech, což samozřejmě ovlivňuje možnosti jejich detekce. Obecně lze říci, že nejvyšší koncentrace fytoplazem v pletivech nadzemních částí rostlin je v druhé polovině vegetačního období, v kořenech jsou fytoplazmy detekovatelné celoročně. V nadzemních částech rostlin, především u dřevin, jsou fytoplazmy distribuovány velmi nerovnoměrně, proto správný odběr vzorků je jednou z nejdůležitějších podmínek jejich úspěšné detekce. Pro potvrzení přítomnosti fytoplazem v rostlině lze využít mikroskopické techniky (elektronová a fluorescenční mikroskopie) nebo biologické testy (roubování indikátorových rostlin), pro určení druhu fytoplazmy je však nezbytné využití molekulárně-biologických metod (Červená a Nečekalová, 2007).

### 2.5.1 VIZUÁLNÍ HODNOCENÍ

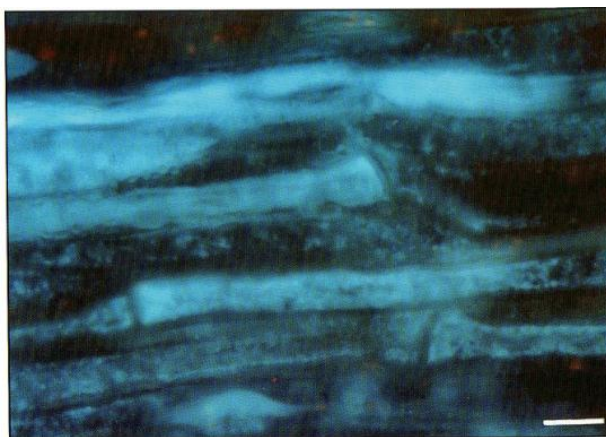
Nejstarší detekční metodou je vizuální hodnocení příznaků onemocnění. K rozpoznání fytoplazmóz jsou nezbytné praktické zkušenosti a podezření je nutné potvrdit alespoň dvěma různými laboratorními testy (Navrátil, 2009).

### 2.5.2 MIKROSKOPICKÁ HODNOCENÍ

Pro detekci fytoplazem má značný význam elektronová a fluorescenční mikroskopie ultratenkých řezů rostlinných pletiv (Kúdela, 2002).

#### **Fluorescenční mikroskopie**

Podstatou fluorescenční mikroskopie je buzení viditelného záření v objektech, které obsahují tzv. fluorochromy (fluorescenční barviva). Ty jsou schopny po ozáření světlem určité vlnové délky svítit v jiné barvě spektra (světlem delší vlnové délky) (Alberts et al. 1998). Tenké řezy (10-15  $\mu\text{m}$ ) fixovaných vzorků se barví DNA fluorochromem DAPI (4'-6-diamino-2-fenylindol). Je-li fytoplazma přítomna, jeví se jako výrazné bílo-modře fluoreskující body a shluky v sítkovicích (obr. 1) (Navrátil a Fialová, 2008).



**Obrázek 1:** fluorescenční signál fytoplazem obarvených pomocí fluorochromu DAPI v sítkovicích aksamitníku (*Tagetes erecta*); měřítko 10  $\mu\text{m}$ . Foto Pavla Válová (Navrátil a Fialová, 2008)

Jelikož se DAPI váže na jakoukoliv DNA, klade metoda vysoké nároky na zkušenosti diagnostika. Ten musí odlišit DNA fytoplazem v sítkovicích od DNA rostlinných organel nebo jiných bakterií. Touto metodou lze fytoplazmy v sítkovicích detekovat, ale ne identifikovat (Navrátil a Fialová, 2008).

## Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie umožňuje studium mikrostruktury zkoumaných objektů ve vakuu pomocí svazku elektronů (Bílý, 2007). Rozlišovací schopnost je 100 krát větší než u světelného mikroskopu a je možné zvětšit obraz více než 200 000 krát, poněvadž elektrony mají velmi krátkou vlnovou délku (~ 5 pm). Existují dva základní typy elektronové mikroskopie: transmisní elektronová mikroskopie a skanovací (rastrovací) elektronová mikroskopie (Seeley et al., 1991).

*Skanovací elektronová mikroskopie (SEM)* se používá k prohlížení povrchových detailů buněk a dalších struktur. Vzorek se pokryje tenoučkou vrstvou těžkého kovu (zlato, platina). Množství elektronů rozptýlených nebo odražených ze vzorku se měří detektorem a je využíváno pro regulaci intenzity následných bodů obrazu, promítaného na obrazovku. Mikroskop vytváří pozoruhodné trojrozměrné obrazy objektů s velkou hloubkou ostrosti a s rozlišením mezi 3 a 20 nm. (Alberts et al., 1998). Pro detekci fytoplazem je tato metoda nepraktická, protože nelze odlišit fytoplazmy od buněčných organel či jiných organismů.

*Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)* se používá k prohlížení tenkých řezů tkání (Alberts et al. 1998). Elektrony pronikají pozorovaným preparátem a interakcemi s ním jsou odchylovány od původního směru, jímž se hlavní svazek pohyboval. Obraz je tvořen dopadem převážně neodchýlených elektronů na zobrazovací systém (Bílý, 2007).

Přestože pomocí TEM lze rozlišit i jedinou fytoplazmu, jejich nerovnoměrná distribuce a nízká koncentrace snižuje úspěšnost jejich nalezení. Mimoto nelze na základě morfologie částic určit, o jaký druh fytoplazmy jde. Ovšem velkým přínosem TEM je možnost detekce i jiných patogenů v preparátu (částice virů, rickettsií, bakterií, apod.). TEM je metoda pracná, časově náročná a finančně nákladná (Navrátil a Fialová, 2008).

Stanovení diagnózy na základě symptomatologie nebo mikroskopických hodnocení za nevhodných okolností může vést k chybné diagnóze a následně k nesprávnému počinání při odstranění onemocnění. Proto je nutné diagnózu potvrdit dalšími spolehlivějšími metodami.

### 2.5.3 SÉROLOGICKÉ METODY

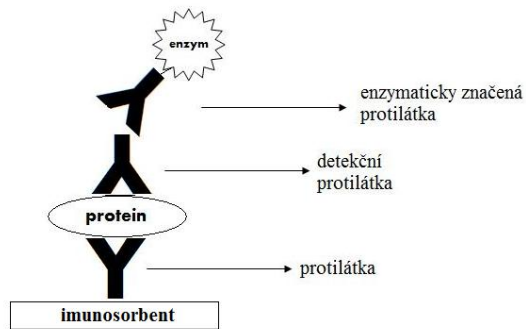
Pokud jsou preparáty z rostlinných patogenů aplikovány do zvířat, jako jsou králíci a myši, během několika dní se objeví v krvi zvířat specifické protilátky. Společný termín pro látky, které vyvolávají tvorbu protilátek, je antigen. Po odběru krve ze zvířete, získáme odstředěním červených krvinek sérum obsahující protilátky (Khan a Dijkstra, 2006). Sérologické metody jsou založeny na specifické *in vitro* reakci specifických protilátek s typem antigenu, který dal podnět k tvorbě těchto protilátek v těle imunizovaného zvířete. Předností sérologické identifikace je její rychlost, specifičnost, citlivost a přijatelná cenová dostupnost nezbytného přístrojového vybavení. Specifičnost zvýšíme použitím monoklonální protilátky (homogenní protilátka proti jediné antigenní determinantě) místo polyklonálního antiséra (obsahuje protilátky proti různým determinantám antigenů) (Kúdela, 2002).

Sérologické diagnostické techniky pro detekci fytoplazem se začaly objevovat v roce 1980. Zahrnují imunofluorescenci, imunosorpční elektronovou mikroskopii a ELISA test (Bertaccini a Duduk, 2009).

#### **Enzymová imunosorpční analýza (ELISA)**

Mezi nejpoužívanější sérologické metody v detekci fytoplazem patří zejména různé modifikace ELISA testu (Navrátil a Fialová, 2008).

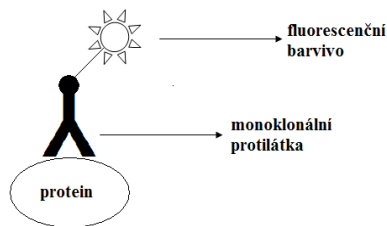
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je imunologický test, v němž je každý po sobě jdoucí imunologický reaktant imobilizovaný na stěny jamek v plastových destičkách tak, že vznikne komplex protilátka-antigen-enzymaticky značená protilátka (obr. 2). První krok spočívá v inkubaci protilátky v jamkách, následuje inkubace antigenu (obsažený v testovaném substrátu). Do jamek se dále přidá antisérum konjugované s enzymem. Po každém kroku přidávání reagensů se jamky promyjí vyrovnávacím pufrům. Optimální podmínky musí být stanoveny empiricky pro každý konkrétní systém. ELISA má více možných variant, ale tento postup je nejběžnější. Přestože je ELISA méně citlivá než metody založené na hybridizaci nukleových kyselin nebo biologických testech, je vhodnější pro běžnou praxi a testování terénních vzorků ve velkém měřítku (Khan a Dijkstra, 2006).



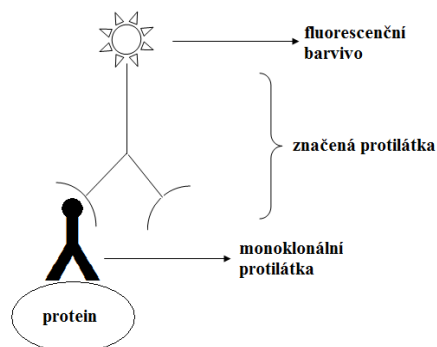
**Obrázek 2: ELISA-test**

### Imunofluorescence

Metoda využívaná ve světelné mikroskopii, kdy je antigen na mikroskopickém preparátu zviditelněn fluorescenčně značenou protilátkou (např. fluorescein isothiokyanát – FITC). Při přímém fluorescenčním barvení (obr. 3) je barvivo navázáno na příslušnou homologní protilátku. Při nepřímém fluorescenčním barvení (obr. 4) se barvivo váže s jinou protilátkou, která se specificky váže na prvně aplikovanou protilátku (Kůdela, 2002).



**Obrázek 3: přímá imunofluorescence**



**Obrázek 4: nepřímá imunofluorescence**

#### 2.5.4 MOLEKULÁRNÍ METODY

Jelikož dosud nebyly fytoplazmy kultivovány in-vitro, opírá se jejich diagnostika hlavně o molekulární techniky. Jsou to například různé modifikace polymerázové řetězové reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP), hybridizace a sekvenování (Weintraub a Jones, 2010).

Ve šroubovici DNA jsou k sobě oba řetězce komplementárně vázány vodíkovými můstky, konkrétně adenin s thyminem a cytosin s guaninem. Tyto interakce jsou základem všech molekulárních hybridizací (Hull, 2009).

#### **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Zatímco do devadesátých let minulého století byly pro detekci fytoplazem využívány zejména metody založené na Dot - Blot hybridizaci nukleových kyselin, v současnosti je hlavním prostředkem pro detekci a identifikaci fytoplazem PCR. Univerzální i skupinově specifické primery pro detekci fytoplazem byly nejprve odvozeny od sekvence 16S rRNA genu, později od sekvencí pro geny ribozomálních proteinů, SecY a Tuf genů. Pro určení diverzity a přesnější identifikaci fytoplazem se využívá genomu mimo oblast 16SrDNA a 23SrDNA, např. amplifikace genů pro ribozomální proteiny rpS3, nebo amplifikaci tuf genu, který kóduje elongační faktor EF-Tu (Navrátil a Fialová, 2008).

PCR umožňuje vytvářet kopie vybraného úseku DNA. Každá nově nasyntetizovaná molekula DNA se stává předlohou pro vznik dalších, čímž se daný úsek exponenciálně namnoží – amplifikuje (řádově desítky až stovky miliard kopií).

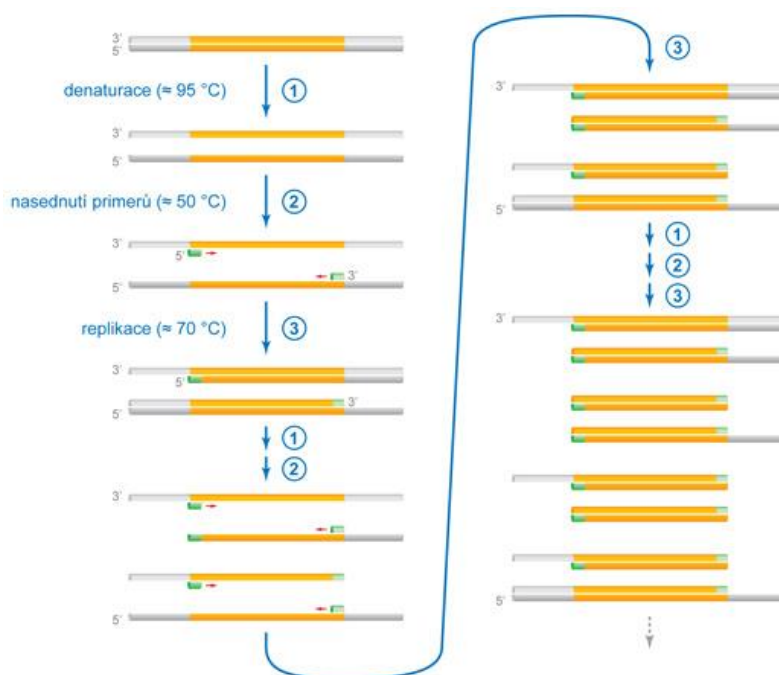
Jednotlivé komponenty PCR:

1. **Původní molekula DNA**, která má být kopírována (templát).
2. K zahájení syntézy DNA jsou potřebné **dva primery**. Jedná se o krátké úseky ssDNA (single-stranded DNA; jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina), které ohraničují oba konce cílové sekvence. Obvykle mají primery 15-20 bází, delší primer je více specifický pro vazbu k přesné cílové sekvenci.
3. K výrobě kopií DNA je potřeba enzym **DNA-polymeráza**. PCR zahrnuje několik vysokoteplotních kroků, pro které je nutná její odolnost. Pochází proto z bakterií *Thermus aquaticus*, které žijí v horkých pramenech při teplotách 90 °C.



4. K vytvoření nové DNA potřebuje polymeráza nukleotidy. Ty jsou dodávány ve formě **nukleosid trifosfátů** (dNTP's) (Clark, 2005).

Celý proces amplifikace lze rozložit na 3 teplotně diferencované kroky (obr. 5). Prvním krokem je denaturace původní ds DNA při teplotě 92 – 96 °C (Mazura et.al., 2001). Ačkoliv jsou v reakci primery od začátku, při teplotě denaturace se na templát vázat nemohou (Clark, 2005). Takže ve druhém kroku (tzv. annealing) klesne teplota na 45-65 °C (dle chemického složení primerů), což primeru umožní komplementárně se navázat k původnímu vláknu. Třetím krokem je prodlužování dceřiného řetězce od ukotvených primerů při teplotě 72 °C za použití dNTPs (Mazura et al., 2001). Teplota 72 °C je optimální pro termostabilní Taq polymerázu k prodlužování řetězce (Clark, 2005). Pevné časové limity každého ze tří výše uvedených kroků ohraničují jeden amplifikační cyklus. Mnohonásobným opakováním tohoto cyklu dochází k amplifikaci studovaného úseku NK (Mazura et al., 2001).



**Obrázek 5:** Schéma PCR. 1) denaturace ds DNA, 2) nasednutí primerů (zelený), 3) prodlužování řetězce – získání výsledného produktu (žlutý). (Kodíček, 2007)

K hodnocení PCR se používá elektroforéza. Základním principem elektroforézy je oddělit molekuly na základě jejich velikosti. Elektricky kladné náboje přitahují záporné a odpuzují kladné náboje a naopak. Dvě elektrody, jedna kladná, druhá záporná, jsou připojené na zdroj vysokého napětí. Kladně nabitě molekuly se pohybují směrem k záporné elektrodě a záporně nabitě molekuly se pohybují

ke kladné elektrodě. Elektroforéza se neprovádí přímo v roztoku, ale na vhodném nosiči – nejčastěji gely, které jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Vzhledem k tomu, že DNA nese záporný náboj na každé z mnoha fosfátových skupin, které tvoří její páteř, bude se na gelu pohybovat směrem ke kladné elektrodě. Protože DNA je přirozeně bezbarvá, je potřeba ji zviditelnit. Jednou z možností je použití barviva (např. Ethidium bromid, Sybr Green), které se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení UV světlem fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. K rozlišení delších fragmentů (100 – 50 000 bp) se využívají gely agarózové, k rozlišení menších molekul se používají gely polyakrylamidové (Rosypal et al., 2002).

Úspěch PCR při detekci fytoplazem v odebraných vzorcích z velké části závisí na získání celkové nukleové kyseliny vysoké kvality obohacené fytoplazmovou DNA. Množství této DNA je nižší než 1 % celkové DNA extrahované z tkáně (Bertaccini a Duduk, 2009). Přestože je PCR nejcitlivější, rychlý a specifický způsob detekce fytoplazem, v praxi se někdy setkáváme s nescifickou amplifikací, kdy produkty neodpovídají očekávané velikosti nebo vzniká více produktů, či dokonce může dojít k amplifikaci DNA jiného organismu (Navrátil a Fialová, 2008).

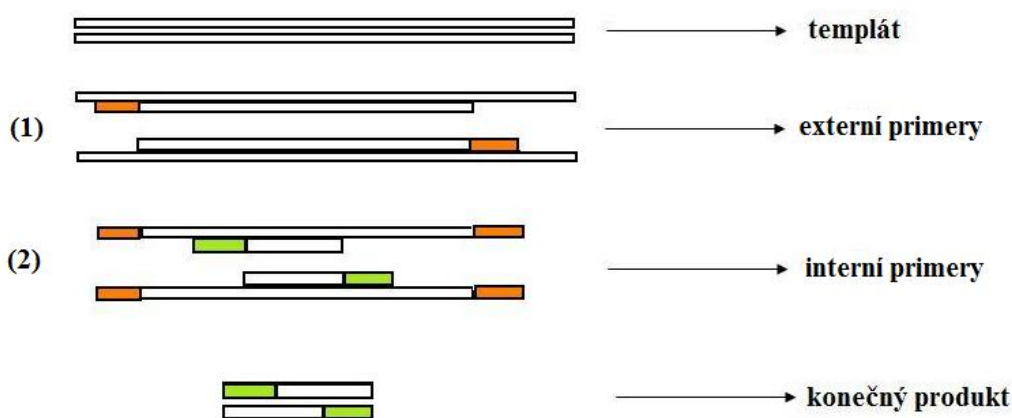
### **„Nested“ PCR**

„Nested“-PCR je jednou z variant PCR a sestává se ze dvou po sobě následujících polymerázových řetězových reakcí (obr. 6). Cílem této PCR je připravit DNA-fragment dostatečného množství a odpovídající čistoty. Většinou vše probíhá v jedné reakci, aby se zabránilo potenciální kontaminaci při doplňování primerů.

Chceme-li provést „nested“ PCR, je třeba předem připravit dva páry primerů (externí, interní), které budou specificky reagovat v očekávané oblasti DNA a zároveň každý z párů primerů bude mít odlišný bod tání,  $T_m$ . Odlišný bod tání interních primerů brání jejich hybridizaci během prvních cyklů amplifikujících fragment ohraničený externími primery (Mazura et al., 2001).

Nested PCR je nezbytná pro namnožení fytoplazmové DNA ze vzorků s neobvykle nízkou koncentrací nebo inhibitory, které mohou narušovat účinnost PCR. Neustálá snaha o zlepšení diagnostických postupů je zaměřena na navrhování rychlejší, úspornější a silnější metody. Citlivost není jen problém sám o sobě, neboť stávající nested PCR protokoly jsou velmi citlivé, ale žádoucí je dosáhnout vysoké úrovně citlivosti bez falešně pozitivních výsledků (Bertaccini a Duduk, 2009).

Většina diagnostických protokolů fytoplazem zahrnuje nejprve PCR amplifikaci řízenou univerzálními primery, následuje PCR se skupinově specifickými primery. Pro konečnou identifikaci kmene může být nutná RFLP analýza. Celý postup vyžaduje časově náročné post-amplifikační kroky (Weintraub a Jones, 2010).



**Obrázek 6:** Schéma „nested“ PCR. První etapa připraví pomocí vnějších primerů delší DNA fragment (1), který je templátem pro amplifikaci kratšího DNA fragmentu (2).

### **Kvantitativní (real-time) PCR**

Tato technika umožňuje sledovat amplifikaci produktu v reálném čase, tj. měřit změnu koncentrace PCR produktu v jednotlivých cyklech reakce a to v absolutních (počet kopií, koncentrace) nebo relativních (% z vybraného produktu) jednotkách. Kvantitativní PCR umožňuje stanovit počet kopií fytoplazmové DNA ve vzorku, a tedy i stanovit koncentraci fytoplazem. Výsledek PCR reakce není nutné hodnotit pomocí gelové elektroforézy (Navrátil a Fialová, 2008).

Principem real-time PCR je použití fluorescenčního barviva, kterým se DNA zviditelní. Moderní přístroje dokáží sledovat několik různých fluorescenčních barviv najednou, takže můžeme teoreticky sledovat více různých reakcí v jedné mikrozkušavce. Nejjednodušší způsob zviditelnění DNA není sekvenčně specifický.

Barvivo (např. SYBR<sup>®</sup> Green I s emisním zářením při 520 nm) se váže pouze na dsDNA a fluoreskuje pouze ve vazbě s DNA. Nevýhodou je, že se barvivo váže na jakoukoliv dsDNA, tedy i na případný nespecifický produkt.

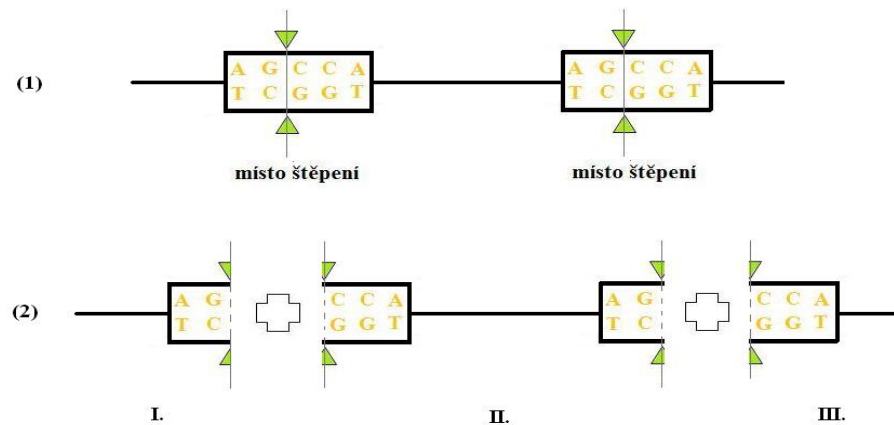
Pro zviditelnění pouze vybraného PCR-produktu je nutné použít specifickou fluorescenční sondu (např. TaqMan<sup>®</sup> sonda), která hybridizuje s určitou cílovou sekvencí uvnitř amplifikovaného regionu. Jejich výhodou je vysoká specifita, jelikož detekce cílové sekvence, probíhá ve dvou stupních – na úrovni vazby primerů a rovněž na úrovni vazby sondy (GENERY BIOTECH, 2009). Tato sonda je oligonukleotid delší než primer a má na 5'-konci fluorescenční značku a na 3'-konci zhášecí (molekula, která pohlcuje záření fluoreskující značky). Sonda se naváže na vnitřní část amplifikované sekvence, a pokud vytváří homoduplex, je rozložena 5' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA-polymerázy. To způsobí ukončení zhášení a fluorescenci (Šmarda et al., 2005). V tomto případě zvýšení fluorescence souvisí přímo s výše specifickou cílovou sekvencí, která je amplifikována (Clark, 2005).

### **RFLP analýza**

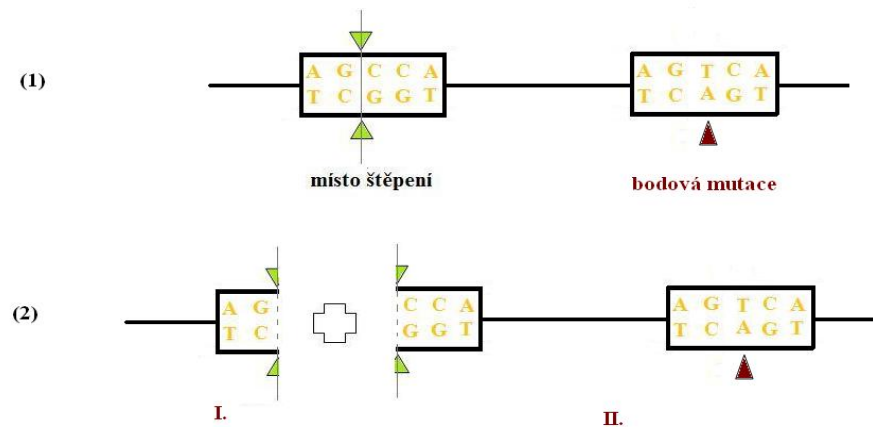
Na PCR může navazovat analýza polymorfizmu délky restričních fragmentů. Amplifikované produkty PCR jsou štěpeny restriční endonukleázou (obr. 7) a poté jsou analyzovány elektroforetickým dělením (Šmarda et al, 2005). Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická (Bertaccini a Duduk, 2009). Nevýhodou této metody je vysoká citlivost k bodovým mutacím.

První ucelené klasifikační schéma fytoplazem bylo založeno na délkovém polymorfismu restričních fragmentů (RFLP) a polymerázové řetězové reakci (PCR) genu 16S rDNA. Systém je tříděn do 19 skupin a více než 40 podskupin. Fytoplazmám bylo připsáno více než 300 různých chorob rostlin, které ovlivňují stovky rostlinných rodů. (Bertaccini a Duduk, 2009).

A)



B)



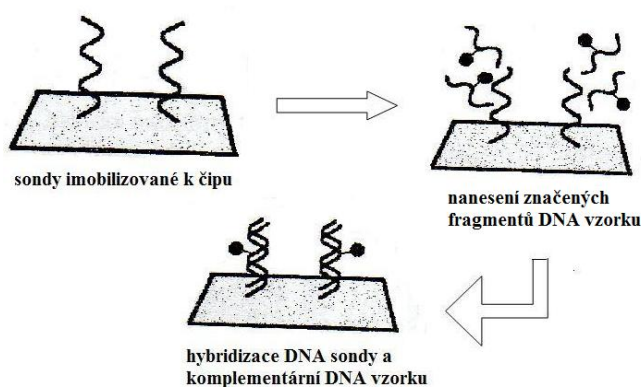
**Obrázek 7:** Ilustrace štěpení RFLP k bodovým mutacím – štěpení dvou izolátů stejné fytoplazmy lišící se pouze jednou bodovou mutací. A) izolát se dvěma štěpnými místy (1), vznikají tři produkty (2). B) izolát s bodovou mutací druhém štěpném místě (1) vznikají jen dva produkty (2)

### Dot-Blot hybridizace

K detekci testovaného organismu se používá molekulární sonda. To je známý oligonukleotid připravený z DNA známého kmene. Hybridizace je omezena jen na ty oblasti, kde DNA sondy a DNA testovaného vzorku sdílejí homologní pořadí nukleotidů. Determinační test se provádí na nitrocelulosové nebo nylonové membráně, kam se nanesou vzorky. Po inkubaci se sondou se výsledek hybridizace (četnost párování) hodnotí autoradiograficky, dozimetricky (sonda značena radioaktivně) nebo kolorimetrickou reakcí (sonda značená enzymem) (Kůdela, 2002).

## DNA mikročipy

Všechny DNA mikročipy jsou založeny na hybridizaci mezi specifickými sondami imobilizovanými k pevnému podkladu (mikročip) a fragmenty cílové sekvence DNA ze vzorku, který má být analyzován (obr. 8). Tato DNA je označena, obvykle fluorescenční barvou. *Oligonukleotidové mikročipy* používají jako sondy syntetické DNA, obvykle 30 – 80 nukleotidů dlouhé. K vyrobení takové sondy je důležité znát sekvence genů, které mají být sledovány. Sondy jsou na mikročipu rozmístěny v několika polích a často v podobě dvojteček, tak aby byla pomocí promítnuté sítě usnadněna identifikace každé sondy a zmenšeno riziko odečtu náhodně vzniklých artefaktů (Mazura et. al., 2001)



Obrázek 8: schéma DNA hybridizace na mikročipu

## Sekvenování

Velmi častým krokem po PCR reakci je sekvenování namnožených fragmentů (Gal, 1996). Cílem sekvenování DNA je stanovení pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Získané nukleotidové sekvence úseku DNA z organismu lze porovnat se sekvencemi v kterékoli z existujících databází. Pomocí těchto databází můžeme třeba zjistit, kterým sekvencím je DNA podobná a na základě toho zařadit patogena. Jeden z nejrychlejších způsobů, jak tyto informace získat, je vyhledávání pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), do kterého se vloží získaná sekvence (Snustad a Simmons, 2009).

Sekvenování má množství aplikací. Znalost sekvence DNA je používána k odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinů, o regulaci jejich tvorby a může též detailně stanovit charakter mutací, které se např. projeví

vznikem genetických chorob (Šmarda et al., 2005). Běžné sekvenování zahrnuje tvorbu dílčích fragmentů všech možných délek templátu (Clark, 2005) s přesně definovanými konci. V současné době se používá několik postupů.

**Chemická metoda** vyvinutá A. Maxamem a W. Gilbertem využívá specifického štěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech báze určitého typu. Výchozím materiálem je soubor identických fragmentů ssDNA na jednom konci označených radioaktivní značkou, který se rozdělí do čtyř vzorků. Každý je vystaven chemikáliím, které specificky štěpí sekvenci DNA v místě, kde rozpoznají jistou nukleotidovou bázi. Fragmenty se následně rozdělí elektroforézou na denaturujícím polyakrylamidovém gelu, který je schopen oddělit řetězce lišící se o jedinou bázi (Rosypal et al., 2002). Dnes už se prakticky nepoužívá.

První technologie použitelná pro rozsáhlejší sekvenování byla vyvinuta Frederickem Sangerem **enzymová metoda**. Používá modifikované nukleotidy (dideoxynukleotid trifosfáty ~ ddNTP's) pro sekvenci specifickou terminaci DNA polymerační reakce (Žák, 2009). Pro amplifikaci DNA se používá asymetrická PCR (pouze 1 primer ~ vznik ssDNA) v termocykleru s použitím *Taq*-polymerázy. Syntéza nového řetězce DNA je ukončena v místě, kde je místo normálního dNTP začleněn jeho analog ddNTP (značen fluorescenční barvou), postrádající 3'-OH skupinu nutnou pro připojení dalšího nukleotidu. Po proběhnutí reakce se vytvořené produkty zdenaturují a rozdělí na polyakrylamidovém denaturujícím gelu nebo ve skleněných kapilárách. Detekce produktů je prováděna pomocí laserového detektoru, který přímo vyhodnocuje sekvenci DNA (Rosypal et al. 2002; Šmarda et al., 2005).

V roce 1998 Mostafa Ronaghi na univerzitě ve Standordu přišel na novou technologii, nazvanou **pyrosekvenování**. Tuto metodu nakonec adaptovala pro své účely firma 454 Life Sciences. Pyrosekvenováním se označuje série enzymatických reakcí, během kterých se zaznamenává začlenění DNA báze do syntetizovaného řetězce díky uvolněnému viditelnému záření. Včlenění kteréhokoliv ze čtyř dNTP (dNTP se přidávají postupně) do komplementárního řetězce k templátové DNA vede k uvolnění pyrofosfátu, sloučeniny, která je dále převedená na ATP. ATP slouží v reakci spřažené s enzymem luciferázou k uvolnění protonu a ke vzniku světelného signálu. Světlo uvolněné při zabudování nového nukleotidu se zaznamenává a tento

cyklus se při prodlužování řetězce komplementárního k sekvenované ssDNA opakuje (Žák, 2009).

**454 sekvenování** posouvá technologii pyrosekvenování o krok dále (souběžně probíhají stovky tisíc až více než milion sekvenačních reakcí) a umožňuje sekvenování třeba i celých genomů. Genomová DNA je mechanicky fragmentována na kratší úseky. PCR probíhá na syntetických kuličkách v olejové emulzi. Jedna molekula sekvenované ssDNA je emulzní PCR namnožena, takže na konci reakce je ke kuličce přichyceno v průměru 10 milionů identických kopií původní ss DNA. Tyto kuličky jsou vpraveny do jamek speciální optické destičky (do jedné jamky se vejde jen jedna DNA kulička) společně s dalšími kuličkami, na které jsou přichyceny enzymy nezbytné pro pyrosekvenování. Naplněná optická destička se vloží do přístroje, kde dochází k vlastnímu pyrosekvenování (Žák, 2009).



### 3. CÍLE PRÁCE

Pro rychlé odhalení fytoplazmových nákaz je potřeba nalézt spolehlivou detekční techniku. Nejsnazší a nejlevnější technikou je právě PCR. Mimo jiné produkty jednokrokové PCR mohou být použity pro analýzu pomocí mikročipů. Proto bylo cílem práce nalezení optimálních primerů a podmínek k amplifikaci vybraných fragmentů fytoplazmového genomu v jednokrokové PCR a využití této techniky k detekci fytoplazem. Zdrojem analýz byly charakterizované sbírkové kmeny fytoplazem ze sbírky prof. Bertaccini a přírodní rostlinné vzorky.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. VZORKY

V této práci byly použity přírodní rostlinné vzorky, ze kterých byla izolována DNA (viz tab. 1).

**Tabulka 1:** rostlinné vzorky k izolaci

rostlina	část rostliny	místo sběru	země
rybíz I	list	České Budějovice	ČR
olše	list	Hluboká nad Vltavou	ČR
dub I	list	Hluboká nad Vltavou	ČR
Tanya 19	list		Tádžikistán
Tanya 20	list		Tádžikistán
slivoň I	list	P. Svince	ČR
rybíz II	list	P. Svince	ČR
hrušeň I	list	Holkov	ČR
hrušeň II	list	H. Svince	ČR
jabloň I	list	P. Svince	ČR
slivoň II	list	P. Svince	ČR
dub II	list	P. Svince	ČR
réva vinná	list	Skřidla	ČR
jabloň II	list	Skřidla	ČR
jahodník	kořen	P. Svince	ČR
jahodník	list	P. Svince	ČR

### Izolace DNA

DNA byla izolována z odebraných rostlinných vzorků pomocí kitu **NucleoSpin<sup>®</sup>**

**Plant II** podle návodu výrobce:

- 1) 100 mg vzorku v třecí misce homogenizujeme se 400  $\mu$ l PL1  $\rightarrow$  filtr se sběrnou zkumavkou  $\rightarrow$  centrifugujeme 1 min. při 11 000 ot./s
- 2) Odstraníme filtr a přidáme 5  $\mu$ l RNase A a 10 minut inkubujeme při 65 °C 10 minut
- 3) Po 10 minutách smícháme s 450  $\mu$ l PC  $\rightarrow$  napipetujeme na kolonku  $\rightarrow$  centrifugujeme 1 minutu při 11 000 ot./s
- 4) Odstraníme kapalinu ze sběrné zkumavky a přidáme 400  $\mu$ l PW1  $\rightarrow$  centrifugujeme 1 minutu při 11 000 ot./s
- 5) Odstraníme kapalinu ze sběrné zkumavky a přidáme 700  $\mu$ l PW2  $\rightarrow$  centrifugujeme 1 minutu při 11 000 ot./s

- 6) Odstraníme kapalinu ze sběrné zkumavky a přidáme 200 µl PW2 → centrifugujeme 2 minuty při 11 000 ot./s
- 7) Kolonku přendáme do nové 1,5 ml eppendorfky a přidáme 50 µl 70 °C PE → inkubujeme 5 minut → centrifugujeme 1 minutu při 11 000 ot./s → znovu přidáme 50 µl 70 °C PE a centrifugujeme 1 minutu při 11 000 ot./s

Ostatní vzorky byly získány ve formě izolované DNA ze sbírky prof. Bertaccini (viz tab. 2).

**Tabulka 2:** izolovaná DNA se sbírky prof. Bertaccini

číslo vzorku	druh fytoplazmy	původ fytoplazmy	skupina (podskupina) 16Sr	testovaný gen
1	Dwarf aster yellows	Clover, CA, USA	I-B	secY
2	Gladiolus witches' broom	Gladiolus with <i>M. quadripunctulatus</i>	I-B	secY
3	Potato witches' broom	Potato, USA	VI	spr, secY, rpS3,tuf
4	Pichris echioides yellows	<i>Pichris echioides</i> , PZ, Italy	IX	spr, secY, rpS3,tuf
5	Grapevine yellows	<i>V. vinifera</i> , BA, Italy	XII	spr, rpS3, secY
6	Ash yellows # 5	<i>Fraxinus americana USA</i>	VII-A	secY, rpS3, tuf
7	Primula red	Bordeaux, France	I-B	secY
8	Pear decline	Pear 207/86t, Germany	X-C	spr, secY, rpS3,tuf
9	X disease	California USA	III-A	secY, rpS3,tuf
10	Plum leptonecrosis	<i>Prunus salicina</i> , Italy	X-B	secY, rpS3,tuf
11	Flower stunting	<i>Psammotettix cephalotes</i> , Germany	XI-C	tuf, rpS3
12	Rape phyllody	Colza, Montfavet, France	I-B	spr
13	Grapevine yellows	<i>V. vinifera</i> , BO, Italy	XII	spr, secY, rpS3,tuf
14	Lettuce yellows	Lettuce, Liguria, Italy	I-B	spr
15	Western X	Peach, CA, USA	III-A	rpS3, tuf
16	Peanut witches' broom	Lee USA	II-A	spr, secY, rpS3,tuf
17	Hydrangea Phyllody	<i>Bordeaux, France</i>	I	spr
18	Poinsettia branching factor	Poinsettia, USA	III-H	rpS3, secY, tuf
19	Chrysanthemum yellows	<i>Chrysanthemum frutescens</i> , Liguria, Italy	I-B	rpS3, spr
20	American aster yellows	Aster, Florida, USA	I-B	spr
21	Grapevine yellows	<i>V. vinifera</i> , TO, Italy	I-B	spr
22	Rubus stunt	<i>Rubus</i> sp. Italy	V-E	spr, secY, rpS3,tuf

**Tabulka 2:** pokračování

číslo vzorku	druh fytoplazmy	původ fytoplazmy	skupina (podskupina) 16Sr	testovaný gen
23	Koolsard aster yellows	<i>Bordeaux, France</i>	I-B	spcr
24	Witches broom disease	Lime, Oman	II-C	rpS3, spcr
25	Chrysanthemum yellows	Chrysanthemum yellows	I-A	spcr
26	Sesame phyllody	Sesame, Thailand	II-A	tuf, rpS3, spcr
27	Aquilegia virescence	<i>Aquilegia alpina, Germany</i>	I-B	secY, tuf, spcr
28	German stone fruit yellows	Apricot, Germany	X-B	spcr, secY, rpS3,tuf
29	Aster yellows	Maryland USA	I-B	rpS3, spcr
30	Potato purple top	Potato France	I-C	rpS3, spcr
31	Apricot chlorotic leafroll	Apricot, Valencia, Spain	I-F	spcr, secY, rpS3,tuf
32	Green Valley X	Cherry, California USA	III-A	secY, rpS3, tuf, spcr
33	Catharanthus virescence	Leafhopper Dossenheim, Germany	I-F	rpS3, spcr
34	Deperissement du lavandin	Lavandin, France	XII-A	rpS3, spcr
35	Elm yellows	<i>Ulmus americana, NY, USA</i>	V-A	spcr, rpS3, tuf, secY
36	Catharanthus virescence	Periwinkle, Thailand	I-B	spcr, rpS3
37	Ash yellows	<i>Fraxinus americana, NY, USA</i>	VII-A	tuf, rpS3

Izolovaná DNA je uchovávána při teplotě -20 °C.

#### 4.2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PCR slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA. K získání specifických genů pro detekci fytoplazem byly použity primery uvedené v tabulce 3. Malá písmena sekvencí představují univerzální úseky připravené pro další práci po amplifikaci, např. klonování. Kombinace primerů jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 3:** použité primery

Název	Sekvence	Amplifikovaný gen	Orientace
spr F1	GAATACGTTCTCGGGGTTTGT	16/23SrRNA	Forward
spr F2	CGATGATTGGGGTTAAGTCG	16/23SrRNA	Forward
spr F3	GGGATGGATCACCTCCTTTC	16/23SrRNA	Forward
spr R1	TTAGTGCCAAGGCATCCACT	16/23SrRNA	Reverse
spr Fa0	GAAGGTGGGGATGGATCACC	16/23SrRNA	Forward
spr Rb0	CTTCATCGGCTCTTAGTGCC	16/23SrRNA	Reverse
spr Fa	gtacgccggagctagGAAGGTGGGGATGGATCACC	16/23SrRNA	Forward
spr Rb	gttacgagcgcgtgaCTTCATCGGCTCTTAGTGCC	16/23SrRNA	Reverse
tuf Fa0	GTTAAAAACATGATTACTGG	tuf	Forward
tuf Rd0	CCTGCTTGAGCAAAATCTA	tuf	Reverse
tuf F1	TCCTGAAGAAAAAGAACGTGG	tuf	Forward
tuf F2	TACTGGTGCTGCTCAAATGG	tuf	Forward
tuf R1	CCAGTAGCAACAGTTCTCTACC	tuf	Reverse
tuf R2	GCAGTGTTTCTTCTCCTTCTT	tuf	Reverse
tuf Fa	gtacgccggagctagAAACATGATTACTGG	tuf	Forward
tuf Rd	gttacgagcgcgtgaCTTGAGCAAAATCTA	tuf	Reverse
secY F1	GCCATTTTAGCAGTTGGTGG	secY	Forward
secY F2	TCGTGAATGGAAAGAACAAGG	secY	Forward
secY R1	TAGGCATCTTGTTTGGATAAATGTTC	secY	Reverse
secY Fa0	CGCGAATGGAAAGACCAAGG	secY	Forward
secY Rb0	CAGGATTGACATTCATAAAAG	secY	Reverse
secY Fa	gtacgccggagctagATGGAAAGACCAAGG	secY	Forward
secY Rb	gttacgagcgcgtgaTGACATTCATAAAAG	secY	Reverse
rpS3 F1	TGGTGGGACATAAATTAGGTGA	rpS3	Forward
rpS3 F2	CGTTTATTTCCAAGAGCTAAAGG	rpS3	Forward
rpS3 R1	TCCACCTAAACGACCTGAAA	rpS3	Reverse
rpS3 Fc0	CCTCGAAAAGCACGTTTAGT	rpS3	Forward
rpS3 Rd0	TACTTTAACTCCTAAAACTCC	rpS3	Reverse

**Tabulka 4:** testované kombinace primerů a délky vzniklých produktů

Amplifikovaný gen	Forward	Reverse	Délka produktu
rpS3	rpS3_F1	rpS3_R1	1004
	rpS3_F2		633
	rpS3_Fc0		498
	rpS3_F1	rpS3_Rd0	1083
	rpS3_F2		721
	rpS3_Fc0		1001
secY	secY_F1	secY_R1	1036
	secY_F2		738
	secY_Fa0	secY_Rb0	700

**Tabulka 4:** pokračování

Amplifikovaný gen	Forward	Reverse	Délka produktu
Tuf	tuf_F1	tuf_R1	532
	tuf_F2		411
	tuf_F1	tuf_R2	812
	tuf_F2		693
	Tuf_Fa0	Tuf_Rd0	551
	Tuf_Fa	Tuf_Rd	542
spcr	spcr_F1	spcr_R1	506
	spcr_F2		395
	spcr_F3		349
	spcr_Fa	spcr_Rb	413
	spcr_Fa0	spcr_Rb0	334

Veškeré chemikálie jsou během práce uchovávány v ledové tříšti.

Do reakční směsi byl použit PCR Master Mix (Fermentas). Reakce byla namíchána podle návodu výrobce (viz tab. 5).

**Tabulka 5:** příprava reakční směsi (uvedeno množství pro jednu reakci)

PCR Master Mix	10,0 µl
reverse primer	1,25 µl
forward primer	1,25 µl
vyizolovaná DNA	0,5 µl
sterilní destilovaná voda	7,0 µl
<b>Celkem</b>	<b>20, 0 µl</b>

PCR probíhala v termocyleru (Peltier Thermal Cycler PTC-200) za následujících teplotních podmínek:

- |             |                      |                        |                                 |
|-------------|----------------------|------------------------|---------------------------------|
| 1)          | 3 min                | 94 °C                  | úvodní denaturace               |
| 2) 40 cyklů | 30 s                 | 93 °C                  | denaturace                      |
|             | 30 s                 | 50-60 °C <sup>*)</sup> | annealing – nasedání primerů    |
|             | 1-2min <sup>*)</sup> | 72 °C                  | elongace – prodlužování řetězce |
| 3)          | 10 min               | 72 °C                  | konečná elongace                |
| 4)          | -                    | 4 °C                   | chlazení                        |

<sup>\*)</sup> hodnoty podle optimálních podmínek jednotlivých reakcí

Pro vyhodnocení PCR produktů byl použit 1 % agarózový gel. 0,2 g agarózy se rozvaří ve 20 ml 0,5x TBE. DNA obarvená Sybr Greenem II se spolu s markerem (standardní restrikční štěp, obsahující fragmenty o známé velikosti) vyfotí pod UV lampou. Hodnocena byla citlivost detekce, která vyjadřuje procentuální zastoupení pozitivních reakcí (+++ 75-100 %, ++ 50-75 %, + 25-50 %, - pod 25 %), a specifita, která vyjadřuje správnost namnoženého fragmentu, tzn., zda výsledný produkt není místo úseku fytoplazmového genomu např. úsekem rostlinného genomu (+ specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt). Zda je produkt specifický zjistíme jeho osekvenováním a porovnáním získané sekvence s databází.

#### 4.3. PURIFIKACE DNA Z PCR REAKCE

DNA byla přečišťována pomocí kitu **NucleoSpin® Extract II** podle návodu výrobce:

- 1) Objem PCR reakce doředíme vodou na 100 µl a přidáme 500 µl NT pufru → přepipetujeme na kolonku → centrifugujeme 1 minutu při 12 000 ot./s.
- 2) Odstraníme kapalinu ze sběrné zkumavky a přidáme 500 µl NT3 pufru → centrifugujeme 1 minutu při 12 000 ot./s.
- 3) Odstraníme kapalinu ze sběrné zkumavky. (Pro úplné odstranění pufru se centrifuguje ještě 2 minuty při 12 000 ot./s. Ethanol z pufru by mohl brzdit enzymatické reakce.) Úplného odstranění můžeme dosáhnout inkubací kolonky po dobu 2-5 minut při 70 °C před elucí.
- 4) Přepipetujeme na kolonku do nové 1,5 ml eppendorfky. Na kolonku přidáme 35 µl vody a 1 minutu inkubujeme při laboratorní teplotě (18-25 °C) → centrifugujeme 1 minutu při 12 000 ot./s. Znovu přidáme na kolonku 35 µl vody a centrifugujeme 1 minutu při 12 000 ot./s.

K ověření správnosti detekce bylo použito sekvenování amplifikovaných produktů. Sekvenování bylo provedeno sekvenačním servisem Biologického centra AV ČR pomocí kitu „Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing“ podle návodu výrobce. Reakční směs byla namíchána podle následujícího schématu:

vzorek	1 µl
primer	1 µl
voda	5,5 µl
celkem	7,5 µl

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 AMPLIFIKACE tuf GENU

Pro tuto oblast bylo testováno 8 primerů (viz tab 3), které byly použity pro 148 reakcí, z nichž 35 vyšlo pozitivně a 113 vyšlo negativně. Jako optimální se ukázal pár tuf\_F2+R1 při 55 °C pro skupiny I-F, III-A, VI a XII (obr. 9). Pro skupiny II-A, V-A, X-C, XI-C se vhodné podmínky pro vznik specifických fragmentů s danými primery nalézt nepodařilo. Zároveň se nepodařilo nalézt vhodné podmínky pro vznik specifických fragmentů pro pár tuf\_F1+R1 u žádné z testovaných skupin (viz tab. 6).

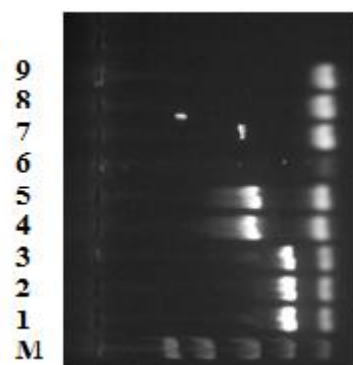
**Tabulka 6:** Přehled testovaných primerů a podmínek u jednotlivých skupin (citlivost detekce: +++ 75-100 %, ++ 50-75 %, + 25-50 %; specificita: + specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt)

ribozomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specificita
I-F	Tuf_F2+R1 Tuf_Fa+Rd	50-60 °C	+++ -	+ -
II-A	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1 Tuf_F2+R2	50 °C 55 °C	- - - -	- - - -
III-A	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1 Tuf_F2+R2 Tuf_Fa0+Rd0	50-60 °C	- - +++ - -	- - + - -
V-A	Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1 Tuf_F2+R2	50 °C 55 °C	- - -	- - -
V-E	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1 Tuf_F2+R2	55 °C	- - + -	- - + -
VI.	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1	55 °C	- - +++	- - +
VII-A	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R1 Tuf_F2+R2	50 °C 55 °C	- - + -	- - + -
IX.	Tuf_F1+R1 Tuf_F1+R2 Tuf_F2+R2	55 °C	- - +	- - +



**Tabulka 6:** pokračování

ribozomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specifická
X-B	Tuf_F1+R1	50-60 °C	-	-
	Tuf_F1+R2		-	-
	Tuf_F2+R1		++	+
	Tuf_F2+R2		-	-
	Tuf_Fa0+Rd0		-	-
X-C	Tuf_F1+R2	50-60 °C	-	-
	Tuf_F2+R1		-	-
	Tuf_F2+R2		-	-
	Tuf_Fa0+Rd0		-	-
XI-C	Tuf_F1+R2	50 °C	-	-
	Tuf_F2+R1	55 °C	-	-
	Tuf_F2+R2		-	-
XII.	Tuf_F1+R1	50-60 °C	-	-
	Tuf_F1+R2		++	+
	Tuf_F2+R1		+++	+
	Tuf_F2+R2		+++	+



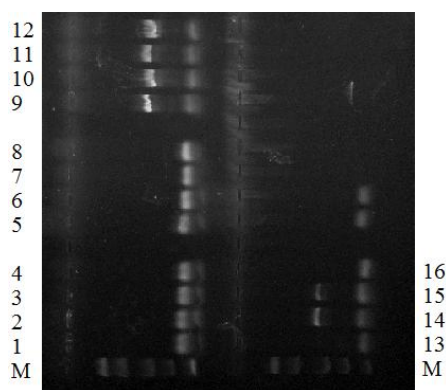
**Obrázek 9:** Elektroforetický snímek. Test primerů tuf\_F2+R1 (reakce 1, 2, 3) tuf\_F1+R2 (reakce 4, 5, 6) a tuf\_F1+R1 (reakce 7, 8, 9) při teplotách 50, 55 a 60 °C u sbírkového vzorku č. 13 (XII). M= marker

## 5.2 AMPLIFIKACE *secY* GENU

Pro tuto oblast bylo testováno 7 primerů (viz tab 3), které byly použity pro 77 reakcí, z nichž 14 vyšlo pozitivně a 63 vyšlo negativně. Jako optimální se ukázal pár *secY\_F2+R1* při 55 °C pro skupiny I-F, III-A a XII (obr. 10). Pro skupiny I-B, II\_A, III-H, V-E, VI, VII-A, IX, X-B a X-C. se vhodné podmínky pro vznik specifických fragmentů s danými primery nalézt nepodařilo. Zároveň se nepodařilo nalézt vhodné podmínky pro vznik specifických fragmentů pro primery *secY\_F1+R1* a *secY\_Fa0+Rb0* u žádné z testovaných skupin (viz tab. 7).

**Tabulka 7:** Přehled testovaných primerů a podmínek u jednotlivých skupin (citlivost detekce: +++ 75-100 %, ++ 50-75 %, + 25-50 %; specificita: + specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt)

ribosomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specificita
I-F	secY_F1+R1 secY_F2+R1	50-60 °C	- +++	- +
I-B	secY_Fa0+Rb0	50-60 °C	-	-
II-A	secY_F1+R1 secY_F2+R1	55 °C	- -	- -
III-A	secY_F1+R1 secY_F2+R1	55 °C	- +++	- +
III-H	secY_F1+R1 secY_F2+R1	60 °C	- -	- -
V-E	secY_F1+R1 secY_F2+R1 secY_Fa+Rb	55°C	- - -	- - -
VI.	secY_F1+R1 secY_F2+R1	55 °C	- -	- -
VII-A	secY_F1+R1 secY_F2+R1	55 °C	- -	- -
IX.	secY_F1+R1 secY_F2+R1	55-60 °C	- -	- -
X-B	secY_F1+R1 secY_F2+R1 secY_Fa0+Rb0	50-60 °C	- - -	- - -
X-C	secY_F1+R1 secY_F2+R1 secY_Fa0+Rb0	50-60 °C	- - -	- - -
XII.	secY_F1+R1 secY_F2+R1 secY_Fa0+Rb0	50-60 °C	- ++ -	- + -



**Obrázek 10:** Elektroforetický snímek. Test primerů secY\_F1+R1 (reakce 1-8) s přidavkem MgCl<sub>2</sub> (reakce 5-8) a secY\_F2+R1 (reakce 9-16) s přidavkem MgCl<sub>2</sub> (reakce 13-16) u sbírkového vzorku č. 31 (I-F) při teplotách 50, 53, 55 a 58 °C. M = marker

### 5.3 AMPLIFIKACE **rpS3** GENU

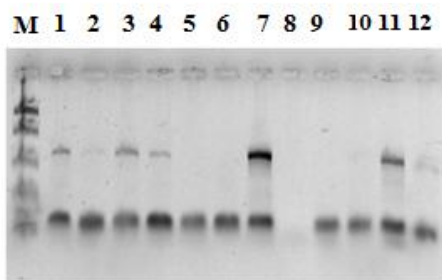
Pro tuto oblast bylo testováno 5 primerů (viz tab. 3), které byly použity pro 176 reakcí, z nichž 48 vyšlo pozitivně a 128 vyšlo negativně. Jako optimální se ukázal pár rpS3\_F1+R1 pro skupiny I, III a X a rpS3\_F2+R1 pro skupiny III, V a XI při 50 °C (obr. 11). Pro skupiny II-A, II-C, VI, VII-A, IX, X-B, XI-C, XII se vhodné podmínky pro vznik specifických fragmentů s danými primery nalézt nepodařilo (viz tab. 8).

**Tabulka 8:** Přehled testovaných primerů a podmínek u jednotlivých skupin (citlivost detekce: +++ 75-100 %, ++ 50-70 %, + 25-50 %; specificita: + specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt)

ribozomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specificita
I-B	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	+++ +++ +++ ++ ++ -	+ + + + + -
I-C	rpS3_Fc0+Rd0	50 °C	++	+
I-F	rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1 rpS3_Fc0+Rd0	50-60 °C	++ - +	+ - +
II-A	rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0	50-60 °C	- - - - -	- - - - -
II-C	rpS3_F1+R1	50-60 °C	-	-
III-A	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1 rpS3_Fc0+Rd0	50 °C	+++ +++ +++ +++ +++ +++	+ + + + + +
III-H	rpS3_F1+R1 rpS3_Fc0+Rd0	50-60 °C	+	+

**Tabulka 8:** pokračování

<b>ribozomální skupina, podskupina</b>	<b>primery</b>	<b>testované podmínky</b>	<b>citlivost detekce</b>	<b>specifická</b>
V-A	rpS3_F1+R1 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F2+R1	50 °C	- + -	- + -
V-E	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50 °C	+++ +++ +++ +++ - +++	+ + + + - +
VI.	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	- - - - - -	- - - - - -
VII-A	rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	- - -	- - -
IX.	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	- - - - - -	- - - - - -
X-B	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_Fc0+Rd0	50-60 °C	- - - - -	- - - - -
X-C	rpS3_Fc0+R1 rpS3_F1+Rd0 rpS3_F2+Rd0 rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1	50-60 °C	+ - - - ++	+ - - - +
XI-C	rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	- - +	- - +
XII	rpS3_Fc0+Rd0 rpS3_F1+R1 rpS3_F2+R1	50-60 °C	- - -	- - -



**Obrázek 11:** Elektroforetický snímek. Test primerů rpS3\_F1+R1 při 50 °C bez přídavku MgCl<sub>2</sub> (reakce 1, 3, 5, 7, 9 a 11) a s přídavkem MgCl<sub>2</sub> (reakce 2, 4, 6, 8, 10, 12) u sbírkových vzorků č. 18 (III-H; reakce 1, 2), 31 (I-F; reakce 3, 4), 5 (XII; reakce 5, 6), 8 (X-C; reakce 7, 8), 3 (VI; reakce 9, 10) a 4 (IX; reakce 11, 12). M = marker.

#### 5.4 AMPLIFIKACE GENU PRO 16/23SrRNA-SPACER

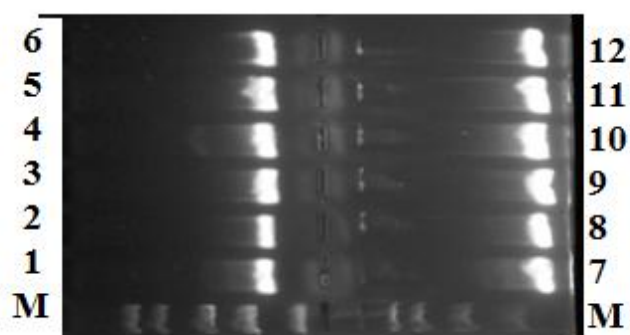
Pro tuto oblast bylo testováno 8 primerů (viz tab 3), které byly použity pro 62 reakcí, z nichž 57 vyšlo pozitivně a 5 vyšlo negativně. Pro amplifikaci této oblasti může být použit kterýkoliv pár primerů při 60 °C pro všechny skupiny (viz tab. 9; obr. 12).

**Tabulka 9:** Přehled testovaných primerů a podmínek u jednotlivých skupin (citlivost detekce: +++ 75-100 %, ++ 50-70 %, + 25-50 %; specificita: + specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt)

ribosomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specificita
I-B	spcr_F1+R1	50-60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Fb0		+++	+
	spcr_Fa+Rb		++	+
I-C	spcr_Fa+Rb	50-60 °C	++	+
I-F	spcr_F1+R1	50-60 °C	+++	+
	spcr_Fa+Rb		+++	+
II-A	spcr_F1+R1	50-60 °C	+++	+
	spcr_F2+R1		+++	+
	spcr_Fa0+Fb0		+++	+
	spcr_Fa+Rb		+++	+
III	spcr_Fa0+Fb0	50-60 °C	+++	+
	spcr_Fa+Rb		+++	+
V-A	spcr_F3+R1	60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
V-E	spcr_F3+R1	60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
VI	spcr_F3+R1	60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+

**Tabulka 9:** pokračování

ribozomální skupina, podskupina	primery	testované podmínky	citlivost detekce	specifita
IX	spcr_F1+R1	60 °C	+++	+
	spcr_F2+R1		+++	+
	spcr_F3+R1		+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
X-B	spcr_F3+R1	60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
	spcr_Fa+Rb		+++	+
X-C	spcr_F3+R1	60 °C	+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
XII	spcr_F1+R1	50-60 °C	+++	+
	spcr_F2+R1		+++	+
	spcr_F3+R1		+++	+
	spcr_Fa0+Rb0		+++	+
	spcr_Fa+Rb		+++	+



**Obrázek 12:** Elektroforetický snímek. Test primerů spcr\_F3+R1 (reakce 1-6) a spcr\_Fa0+Rb0 (reakce 7-12) při 60 °C u sbírkových vzorků č. 22 (V-E), 35 (V-A), 3 (VI), 4 (IX), 8 (X-C) a 28 (X-B). M = marker

## 5.5 OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY A PRIMERY PRO DETEKCI FYTOPLAZEM

Celkem bylo připraveno 463 reakcí, z nichž 154 vyšlo pozitivně a 309 vyšlo negativně. V rámci testování byl zkoušen i hořčikový gradient, který ovšem výsledky nijak významně neměnil. Nejvhodnějšími primery pro detekci fytoplazem se ukázaly rpS3\_F1+R1 a rpS3\_F2+R1 za optimálních teplotních podmínek 50 °C a sPCR\_Fa0+Rb0 při 60 °C (viz tab. 10).

**Tabulka 10:** optimální podmínky a primery pro detekci fytoplazem u jednotlivých skupin

ribosomální skupina	primery	optimální podmínky
I	secY_F2+R1	55 °C
	tuf_F2+R1	55 °C
	rpS3_F1+R1	50 °C
	sPCR_F1+R1	60 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
II	sPCR_F1+R1	60 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
III	Tuf_F2+R1	55 °C
	secY_F2+R1	55 °C
	rpS3_F1+R1	50 °C
	rpS3_F2+R1	50 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
V	rpS3_Fc0+R1	50 °C
	rpS3_F1+Rd0	50 °C
	rpS3_F2+Rd0	50 °C
	rpS3_Fc0+Rd0	50 °C
	rpS3_F2+R1	50 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
VI	tuf_F2+R1	55 °C
	rpS3_F2+R1	50 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
VII	tuf_F2+R1	55 °C
	rpS3_F2+R1	50 °C
IX	rpS3_F1+R1	50 °C
	sPCR_F1+R1	60 °C
X-B	rpS3_Fc0+R1	50 °C
	rpS3_F1+R1	50 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C
XI	-	-
XII	Tuf_F2+R1	55 °C
	sPCR_Fa0+Rb0	60 °C

## 5.6 DETEKCE FYTOPLAZEM V PŘÍRODNÍCH VZORCÍCH

Celkem bylo testováno 16 vzorků, ze kterých bylo připraveno 97 reakcí. Fytoplazma byla detekována pouze v kořenu jahodníku. Specificita pozitivní reakce byla potvrzena sekvenováním i hybridizací na mikročipu, pomocí kterých se podařilo fytoplazmu zařadit do skupiny III. U ostatních vzorků, kde citlivost detekce vykazovala pozitivní výsledky (viz tab. 11), se přítomnost fytoplazmy potvrdit nepodařilo. Produkty neodpovídaly očekávané velikosti nebo vznikalo více produktů. Sekvenováním těchto vzorků byly získány dvě překrývající se sekvence, které nelze přečíst. Sekvenování potvrdilo i amplifikaci DNA jiného organismu.

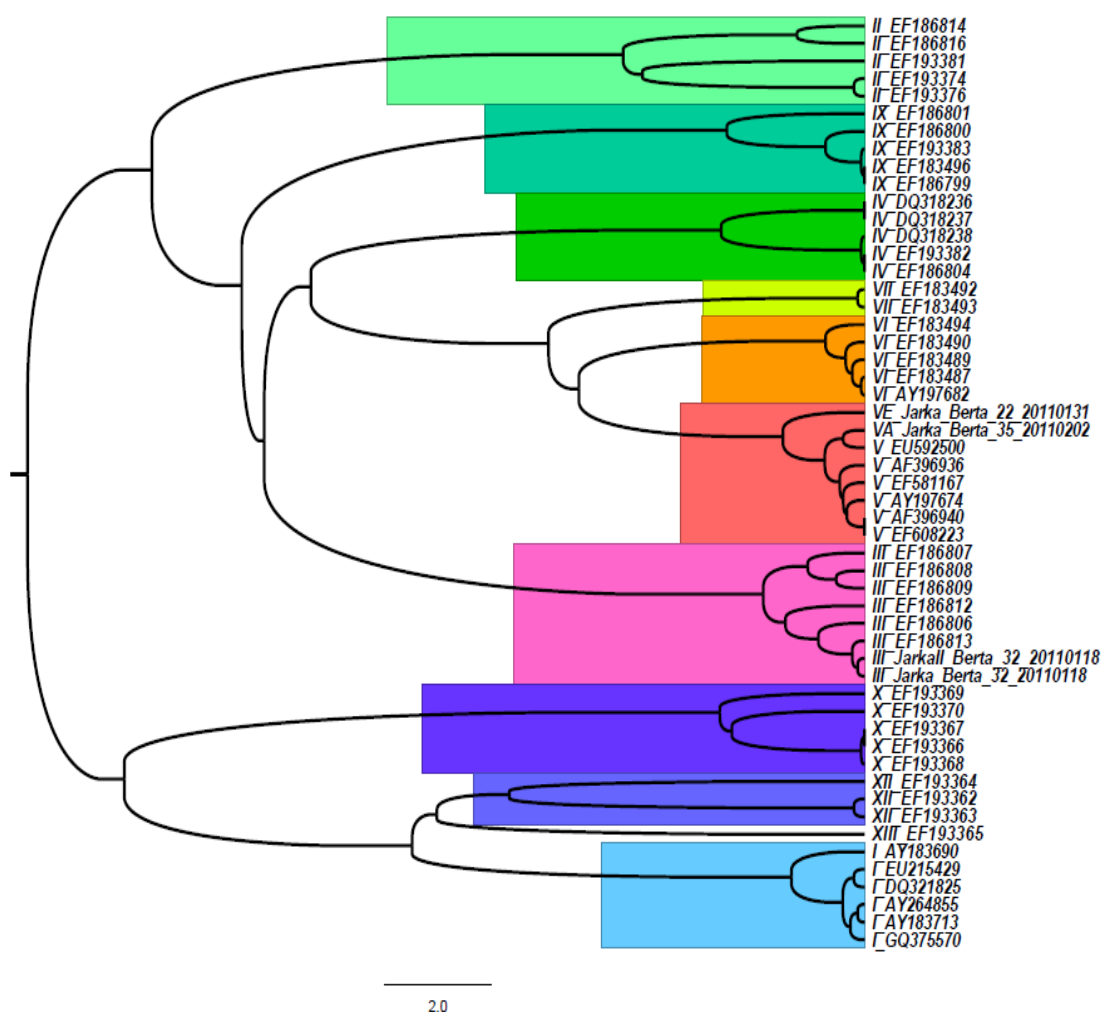
**Tabulka 11:** detekce fytoplazem v přírodních vzorcích (citlivost detekce: +++ 75-100 %, ++ 50-70 %, + 25-50 %; specificita: + specifický produkt, - nespecifický nebo žádný produkt)

vzorek	primer	podmínky	citlivost detekce	specificita
Tanya 19	spr_F1+R1	60 °C	++	-
	spr_F2+R1	50-60 °C	++	-
	secY_F2+R1	50-60 °C	-	-
	rpS3_F1+R1	50-60 °C	-	-
	rpS3_F2+R1	50-60 °C	-	-
Tanya 20	spr_F1+R1	60 °C	+	-
	spr_F2+R1	50-60 °C	+	-
dub I	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
dub II	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
réva vinná	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
slivoň I	spr_F1+R1	60 °C	-	-
	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
slivoň II	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
jabloň I	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
jabloň II	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
rybíz I	spr_F1+R1	60 °C	-	-
	spr_F2+R1	60 °C	-	-
jahodník – list	spr_F1+R1	60 °C	-	-
	spr_F2+R1	50-60 °C	++	-
	secY_F1+R1	50-60 °C	-	-
	secY_F2+R1	50-60 °C	-	-
	rpS3_F1+R1	50-60 °C	+	-
	rpS3_F2+R1	50-60 °C	-	-
	tuf_F1+R1	50-60 °C	-	-
jahodník – kořen	rpS3_F1+R1	55 °C	-	-
	rpS3_F2+R1	55 °C	-	-
	spr_F1+R1	60 °C	++	+
	spr_F2+R1	60 °C	+	-
	spr_F3+R1	60 °C	+	-
	secY_F1+R1	55 °C	-	-
	secY_F2+R1	55 °C	-	-

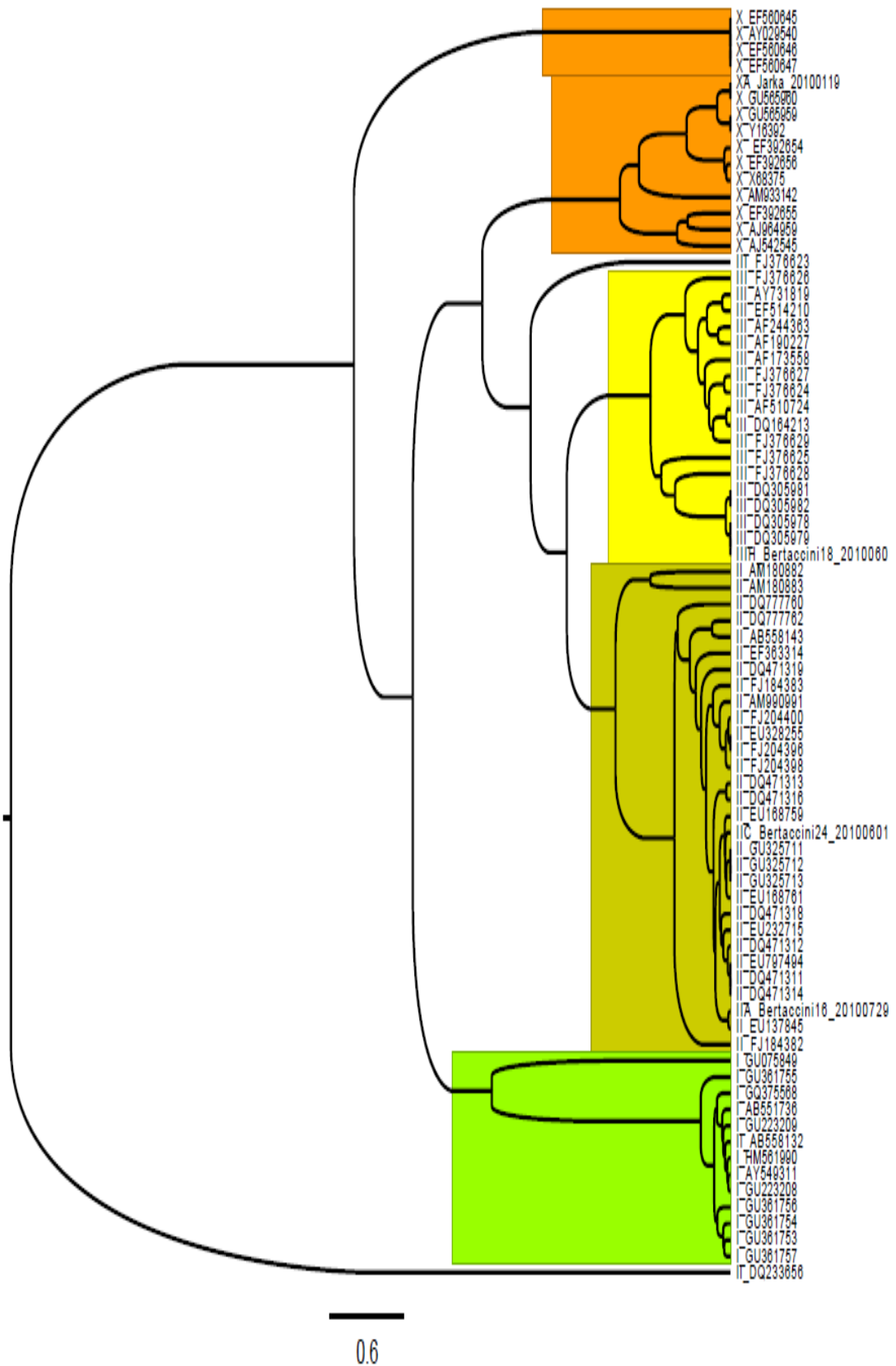


## 5.7 FYLOGENETICKÁ ANALÝZA

Zda se mohou amplifikované geny (tuf, secY, rpS3, spacer) využít k rozdělení fytoplazem do skupin bylo zjišťováno pomocí fylogenetické analýzy. Pro tuto analýzu byly použity vybrané sekvence z databáze GenBank a sekvence vzorků získané v průběhu práce. Z fylogenetické analýzy vyplývá, že nejvhodnějším genem pro zařazení do skupin je gen rpS3 (obr. 13). Gen pro 16/23SrRNA-spacer není vhodný pro svou vysokou variabilitu mezi skupinami. Dokládají to i dvě databázové sekvence ze skupiny II (přístupová čísla z GenBank: AB558132 a DQ233656), které jsou fylogeneticky řazeny mimo skupinu II (obr. 14). Toto zařazení může být způsobeno použitím krátkých sekvencí (349 bp) k vytvoření fylogenetického stroměčku. Nejedná se tedy o celý spacer, ale jen o jeho část a další kousek těchto sekvencí může být shodný se skupinou II.

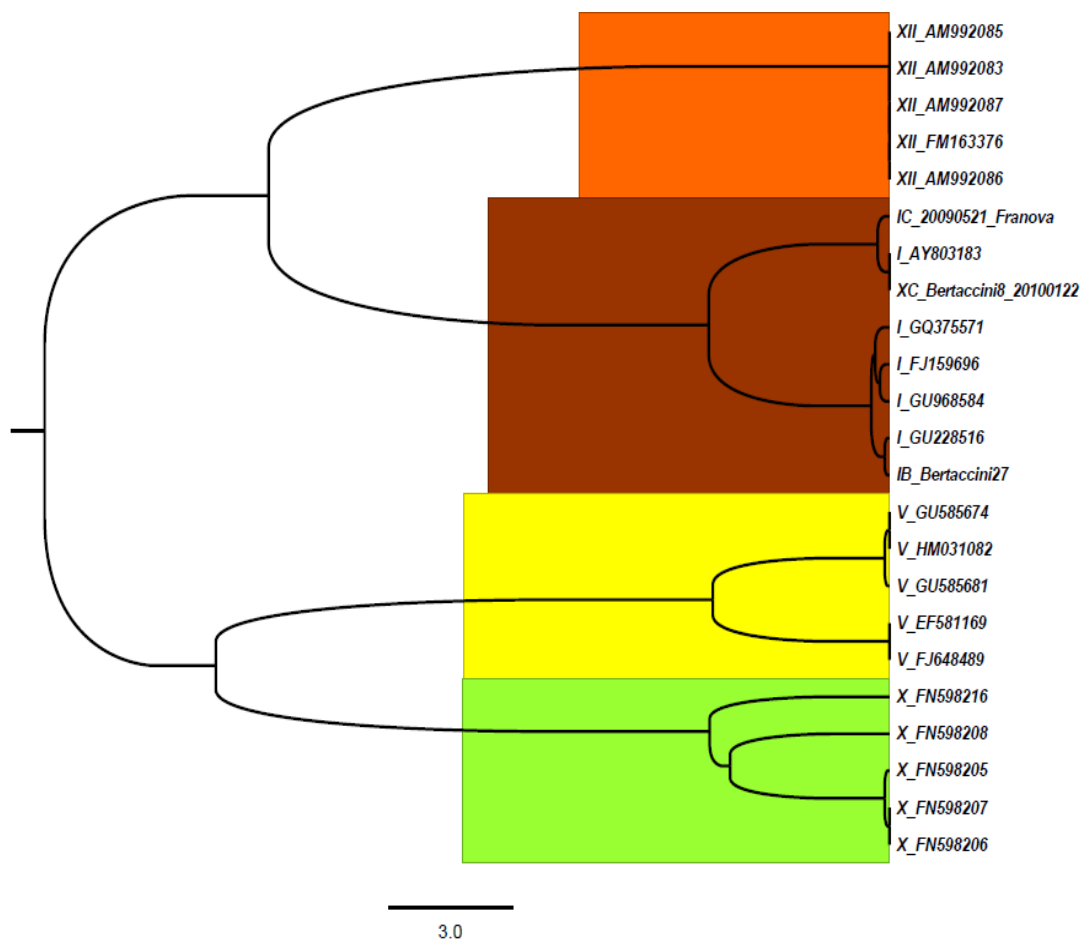


**Obrázek 13:** fylogenetický strom osekvenovaných sbírkových vzorků a zástupců fytoplazmových skupin databázových sekvencí genu rpS3



**Obrázek 14:** fylogenetický strom zástupců fytoplazem ze skupin I, II, III a X z databázových sekvencí a osekvenovaných sbírkových vzorků pro 16/23SrRNA-spacer.

Na obrázcích 15 a 17 pro gen *secY* je získaná sekvence vzorku XC\_Bertaccini8 zařazena do skupiny I. Obrázek 16 ilustruje odlišnosti databázových sekvencí skupin X a I. Mezi sekvencemi těchto skupin je zařazena získaná sekvence vzorku XC\_Bertaccini8. Z tohoto srovnání je patrné, že tato získaná sekvence se spíše podobá sekvencím ze skupiny I.



**Obrázek 15:** fylogenetický strom osekvenovaných sbírkových vzorků a zástupců fytoplazmových skupin databázových sekvencí genu *secY*

```

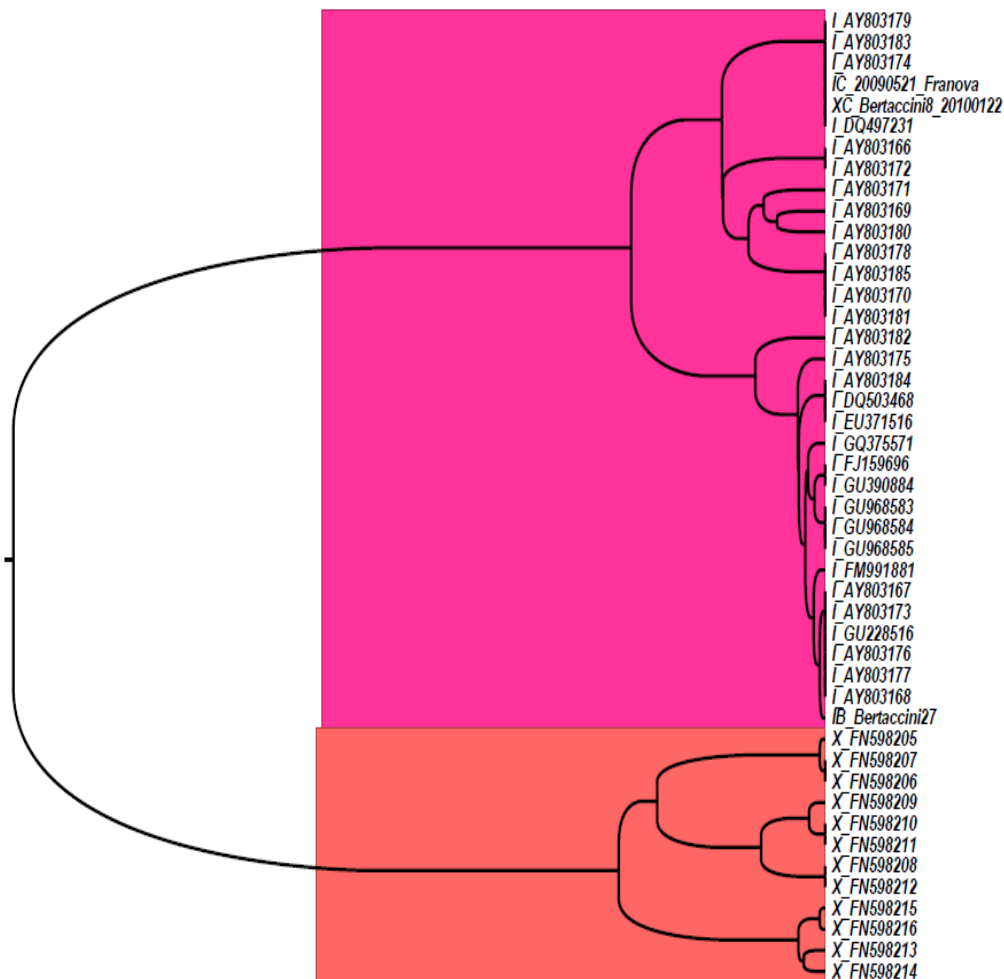
>X_FN598214 TAATTACTACTTTT-----CAAATAATTTG-----CATTTTGGAAATACAGACAAAATTAA
>X_FN598213 TAATTACTACTTTT-----CAAATAATTTG-----CATTTTGGAAATACAGACAAAATTAA
>XC_Jarka TAATTAATCTATTTGCAAATTTGAACAAATCATATTTATCTCAAAATAATTTTTAACTTTAAAACTTTTA
>I_AY803179 TAATTAATCTATTTGCAAATTTGAACAAATCATATTTATCTCAAAATAATTTTTAACTTTAAAACTTTTA
>I_AY803169 TAATTAATCTATTTGCAAATTTGAACAAATCATATTTATCTCAAAATACTTTTTAACTTTAAAACTTTTA

>X_FN598214 ATTTTGTGCTTTAT-TGTTTCTTTTATATTTATTTTAATAATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAA
>X_FN598213 ATTTTGTGCTTTAT-TGTTTTTTTATATTTATTTTAATAATCTACTATTATAGTTTATTTAGCTACTTTAA
>XC_Jarka ATTTTGCATGTATTGTTCTTTTGTCTCTTTTATTTTAATTTTACTGTAGTTTGGCAAATAACATCTTTAA
>I_AY803179 ATTTTGCATGTATTGTTCTTTTGTCTCTTTTATTTTAATTTTACTGTAGTTTGGCAAATAACATCTTTAA
>I_AY803169 ATTTTACATGTATTGTTCTTTTGTCTCTTTATTTTAATTTTACTGTAGTTGTCGCAAATAACATCTTTAA

>X_FN598214 AAATCCCTATTATTTATCTTAATAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCTCTG
>X_FN598213 AAATCCCTATTATTTATCTTAATAAAAAAGTCAAGTAGAAAATTATATTCCTTTAAAAATTAATGTTCTCTG
>XC_Jarka AAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGCGCAAGGCAAAAAGCTACATTCATTAAAAATTAATAGTGCAG
>I_AY803179 AAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGCGCAAGGCAAAAAGCTACATTCATTAAAAATTAATAGTGCAG
>I_AY803169 AAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGAAGGCAAAAAGCTACATTCATTAAAAATTAATAGTGCAG

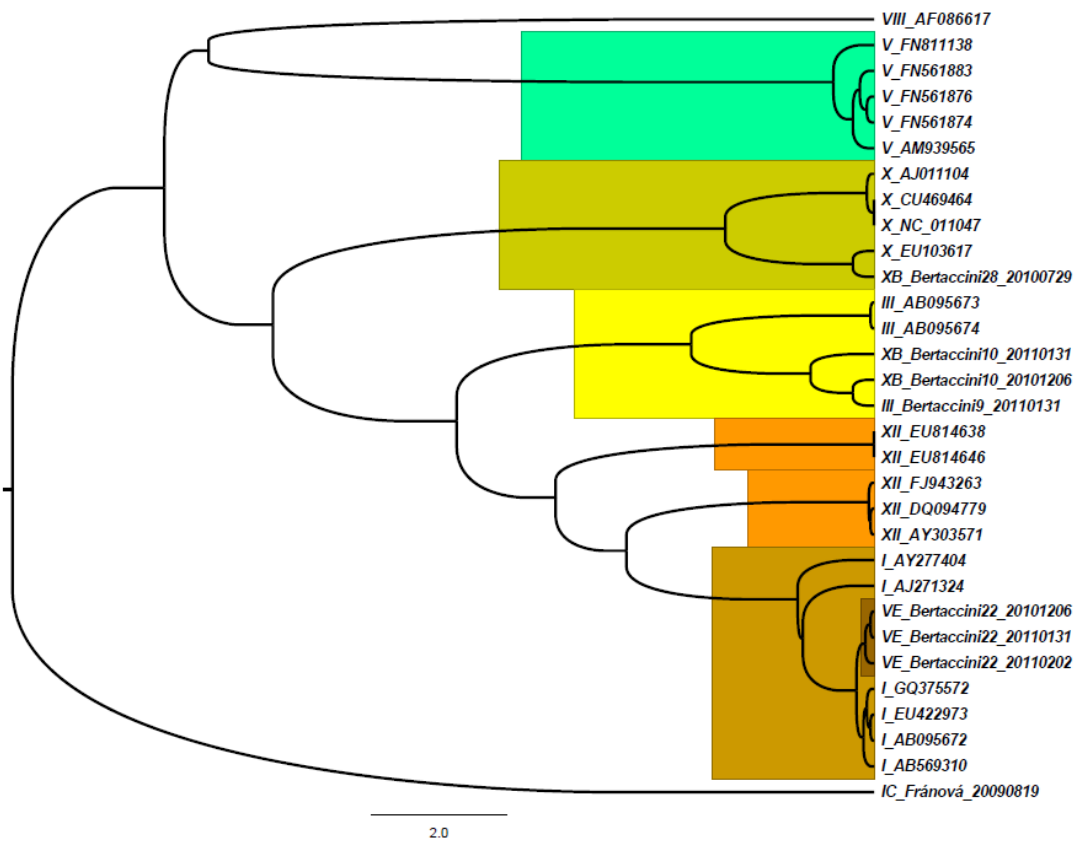
```

**Obrázek 16:** Porovnání podobnosti sekvence XC\_Jarka (Bertaccini 8) s databázovými sekvencemi fytoplazem ze skupin I a X.



**Obrázek 17:** fylogenetický strom zástupců fytoplazem ze skupin I a X z databázových sekvencí a osekvenovaných sbírkových vzorků pro secY gen.

Jak je patrné z obrázku 18, ani tuf gen není příliš vhodný k případnému rozlišení skupin. Toto zařazení může být způsobeno buď velkou variabilitou mezi skupinami nebo použitím příliš krátkých sekvencí (max. 350 bp).



**Obrázek 18:** fylogenetický strom osekvenovaných sbírkových vzorků a zástupců fytoplazmových skupin databázových sekvencí tuf genu

## 6. DISKUZE

PCR je rychlá a vysoce citlivá metoda. Jako templát pro PCR reakci může teoreticky posloužit jediná molekula DNA. Je využívána k detekci i u rostlin s velmi nízkou koncentrací fytoplazem. Následnou analýzou získaných fragmentů je možné detekované fytoplazmy zařadit do jednotlivých skupin a podskupin.

Přestože je PCR nejcitlivější, specifický a rychlý způsob detekce, v praxi se někdy setkáváme s falešně pozitivními výsledky. To se stalo i v případě detekce fytoplazem v přírodních vzorcích, kdy vzniklé produkty neměly očekávanou velikost, vznikalo více produktů a následně byla sekvenováním zjištěna amplifikace DNA z agrobakterií. Příčinou mohla být např. kontaminace, přítomnost inhibitorů v izolátech nebo špatně zvolený PCR program.

Cílem práce tedy bylo nalezení optimálních primerů k amplifikaci vybraných fragmentů fytoplazmového genomu. Primery sloužící k optimální amplifikaci těchto fragmentů se podařilo nalézt pro všechny testované geny, ale ne pro všechny fytoplazmové skupiny. Příčinou může být návrh primerů podle sekvencí fytoplazem z databáze. Konzervované oblasti dosud neosekvenovaných skupin nemusí být shodné s dostupnými zástupci. Proto byly navrženy nové primery do jiné konzervované oblasti, které se nyní testují. Mimo jiné může vzorek obsahovat inhibitory, které nedovolí reakci správně proběhnout. V takovém případě může pomoci naředění vzorku, kterým snížíme jejich koncentraci.

Dalším cílem práce bylo využití jednokrokové PCR k detekci fytoplazem, do kterého byly zapojeny i přírodní vzorky pro optimalizaci detekce v reálných podmínkách. U detekce fytoplazem v přírodních vzorcích musí být brán v úvahu již samotný sběr vzorků. Jako fakt musíme brát velmi nerovnoměrnou distribuci fytoplazem v nadzemních částech dřevin. Dalším limitujícím faktorem může být množství fytoplazem, které v průběhu roku v nadzemních částech kolísá. Během zimního období se fytoplazmy nacházejí hlavně v kořenových systémech a na jaře rekolonizují nadzemní části. Vzorky použité pro tuto práci neměly výrazné příznaky, byly vybírány pouze jako podezřelé a sběr byl prováděn na podzim. Tím by se dal vysvětlit fakt, že se fytoplazmu ve vzorku jahodníku získaného na podzim, podařilo detekovat v kořenech a ne v jeho nadzemních částech. Je možné, že se fytoplazmy nacházejí i v dalších izolátech, ale pomocí mikročipu ani sekvenováním se

nepodařilo tento fakt ověřit. Jejich přítomnost se musí potvrdit další molekulární metodou.

V práci bylo dále zjišťováno, zda se mohou amplifikované geny použít k rozdělení fytoplazem do skupin. Fylogenetické řazení detekovaných fytoplazem k jiným skupinám, než je konkrétní fytoplazma určena, může být způsobeno vysokou variabilitou mezi skupinami, ale i uvnitř skupin, právě jako je tomu v případě genu pro 16/23SrRNA-spacer. Pro pravdivé výsledky musíme porovnávat stejně dlouhé fragmenty. Problém je ale v tom, že čím kratší úsek se porovnává, tím menší má výsledek vypovídací schopnost. Výsledek nezahrnuje dost charakteristických úseků pro příslušné skupiny. K tomu s největší pravděpodobností došlo v případě fylogenetického stromečku pro tuf gen, kde velikost porovnávaného fragmentu osekvenovaného v rámci této práce nepřesáhla 350 bp. Další příčinou může být právě již zmíněná kontaminace vzorku či špatné určení skupiny databázové či sbírkové fytoplazmy jako tomu bylo v případě sbírkového vzorku 8 (X-C) u secY genu.

Výsledky předkládané bakalářské práce byly využity při výzkumu detekce fytoplazem pomocí mikročipů, které se řeší na oddělení Virologie, Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR, v.v.i.) a při přípravě publikace v mezinárodním impaktovaném časopise. V době odevzdání bakalářské práce byl článek odeslán k posouzení do časopisu (O. Lenz, J. Markova, T. Sarkisova -Discriminating 16Sr groups of phytoplasma by an oligonucleotide microarray targeting 16S-23S ribosomal spacer).

## 7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo nalezení optimálních primerů k amplifikaci vybraných fragmentů fytoplazmového genomu v jednokrokové PCR a využití této techniky k detekci fytoplazem. Pro tuto studii bylo použito 37 vzorků ze sbírky fytoplazem od prof. Bertaccini. Nejvhodnějšími primery pro detekci fytoplazem se ukázaly rpS3\_F1+R1 a rpS3\_F2+R1 za optimálních teplotních podmínek 50 °C a spr\_Fa0+Rb0 při 60 °C. Pomocí optimalizovaných primerů bylo testováno 16 přírodních vzorků. Fytoplazmu se podařilo detekovat v kořenu jahodníku a navíc bylo zjištěno detekci na mikročipu a sekvenováním, že přísluší do skupiny III. U přírodních vzorků Tanya19, Tanya20 a listu jahodníku se nepodařilo přítomnost fytoplazmy potvrdit, ale ani vyvrátit. Výsledky byly využity při výzkumu detekce fytoplazem pomocí mikročipů, které se řeší na oddělení Virologie, Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum, AV ČR, v.v.i.) a při přípravě publikace v mezinárodním impaktovaném časopise.



## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie*. 2. vydání. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 2006. xxvi, 630, [110] s. ISBN 80-902906-2-0.

BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia mediterranea* . 2009, 48, 3, s. 355-378. ISSN 0031-9465.

BÍLÝ, T. *Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie*. České Budějovice, 2007. 79 s. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita, Pedagogická fakulta. Dostupné z WWW: <[http://stag-web.jcu.cz/apps/stag/diplom/index.php?download\\_this\\_unauthorized=6013](http://stag-web.jcu.cz/apps/stag/diplom/index.php?download_this_unauthorized=6013)>.

BOSS, L. *Plant viruses, unique and intriguing pathogens a textbook of plant virology*. Leiden : Backhuys Publishers, 1999. 358 s. ISBN 90-5782-012-9.

CLARK, David P. *Molecular biology*. Amsterdam : Elsevier, 2005. xviii, 784 s s. ISBN 0-12-175551-7.

ČERVENÁ, G.; NEČEKALOVÁ, J. *Státní rostlinolékařská správa* [online]. Praha : Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, 2007 [cit. 2010-10-26]. Fytoplazmy na révě vinné. Dostupné z WWW: <[http://www.srs.cz/portaldoc/o\\_nas/publikace\\_srs/Fytoplazmy%20na%20reve.pdf](http://www.srs.cz/portaldoc/o_nas/publikace_srs/Fytoplazmy%20na%20reve.pdf)>.

DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASNYAMA, H. Mycoplasma or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellow, or Paulownia Witches' Broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan*. 1967, 33, s. 259-266.

GARCIA-CHAPA, M.; BATLLE, A.; REKAB, D.; ROSQUETE, M. R.; FIRRAO, G. PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 56, 2, s. 231-242. ISSN 0167-7012.

*GENERI BIOTECH : Compounds and services for molecular biology* [online]. c2009 [cit. 2011-03-22]. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR). Dostupné

z WWW: <<http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>>.

HREN, M.; RAVNIKAR, M.; BRZIN, J.; ERMACORA, P.; CARRARO, L.; BIANCO, P. A.; CASATI, P.; BORGIO, M.; ANGELINI, E.; ROTTER, A.; GRUDEN, K. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant pathology*. 2009, 58, 1, s. 170-180. ISSN 0032-0862.

HOGENHOUT, S. A.; OSHIMA, K.; AMMAR, E.; KAKIZAWA, S.; KINGDOM, H. N.; MANBA, S. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insect. *Molecular plant pathology*. 2008, 9, 4, s. 403-423. ISSN 1464-6722.

CHRISTENSEN, N. M.; AXELSEN, K. B.; NICOLAISEN, M.; SCHULZ, A. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in plant Science*. 2005, 10, 11, s. 526-535. ISSN 1360-1385.

KAZDA, J.; PROKINOVÁ, E.; RYŠÁNEK, P. *Škůdci a choroby rostlin : Domáci rostlinolékař*. 1. vydání. Praha : Euromedia Group k.s. - Knižní klub, 2007. 288 s. ISBN 978-80-242-1886-1.

KHAN, J. A.; DIJKSTRA, J.. *Handbook of Plant Virology*. New York : Food Products Press, 2006. 452 s. ISBN 1-56022-979-9.

KODÍČEK, M. *reakce polymerasová řetězová*. From [Biochemické pojmy : výkladový slovník](#) [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2011-03-03]. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=reakce\\_polymerasova\\_retezova](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=reakce_polymerasova_retezova)>

KUBE, M.; SCHNEIDER, B.; KUHLE, H.; DANDEKAR, T.; HEITMANN, K.; MIGDOLL, A.; REINHARD, R.; SEEMÜLLER, E. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC GENOMICS*. 2008, č. 9. ISSN 1471-2164.

KŮDELA, V.; NOVÁČEK, A.; FUCIKOVSKÝ, L. *Rostlinolékařská bakteriologie*. 1. vydání. Praha : Academia, 2002. 347 s. ISBN 80-200-0899-3.

MAZURA, I.; MICHALOVÁ, K.; BRDIČKA, R.; MÁCHA, J. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha : Karolinum, 2001. 101 s. ISBN 80-246-0258-X.

NAVRÁTIL, M. Karanténní choroby jaderovin : Chřadnutí hrušně, proliferace jabloně. *Zahradkář : časopis Českého zahradkářského svazu*. 2010, 42, č. 1, s. 40-41. ISSN 0139-7761.

NAVRÁTIL, M. Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. *Zahradkář : časopis Českého zahradkářského svazu*. 2009, 41, 7, s. 38-39. ISSN 0139-7761.

NAVRÁTIL, M. Fytoplasma evropské žloutenky peckovin : Původce závažné karanténní choroby. *Zahradkář : časopis Českého zahradkářského svazu*. 2009, 41, č. 11, s. 36-37. ISSN 0139-7761.

NAVRÁTIL, M.; FIALOVÁ, R. *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Olomouc : Česká fytopatologická společnost a Universita Palackého v Olomouci, 2008. 156 s. ISBN 80-903545-2-1.

ROSYPAL, S.; DOŠKAŘ, J.; PETRZIK, K.; RŮŽIČKOVÁ V. *Úvod do molekulární biologie : Čtvrtý díl. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. třetí inovované vydání. Brno : Stanislav Rosypal, 2002. 904-1200 s. ISBN 80-902562-4-4.

SEELEY, H. W.; VANDEMARK, P. J.; LEE, J. J. *Microbes in action : A Laboratory Manual of Microbiology*. New York : W. H. Freeman and company, 1991. 450 s. ISBN 0-7167-2100-7.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Genetika*. Brno : Masarykova univerzita, 2009. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

WALKEY, D. G. A. *Applied Plant Virology*. second edition. London : Chapman and Hall, 1991. 338 s. ISBN 0-412-35740-2.

WANG, J., et al. Genetic and serological analyses of elongation factor EF-Tu of paulownia witches'-broom phytoplasma (16SrI-D). *Plant pathology*. 2010, 59, 5, s. 972-981. ISSN 0032-0862.

WEINTRAUB, P. G.; JONES, P. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford : CABI, 2010. 331 s. ISBN 978-1-84593-530-6.

ŽÁK, P. Nové možnosti v sekvenování : sekvenátor GS-FLX. *Labor Aktuell*. 2009, č. 3, s. 27-31. Dostupný také z WWW: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0309/Sekvenator.pdf>>.

## 9. PŘÍLOHY

## 9.1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MLO's	mycoplasma-like organism (mykoplazmám podobné organismy)
AP	apple proliferation phytoplasma (fytoplasma proliferace jabloně)
PD	pear decline phytoplasma (fytoplasma chřadnutí hrušně)
ESFY	European stone fruit yellows phytoplasma (fytoplasma evropské žloutenky peckovin)
dsDNA	double-stranded DNA (dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina)
ssDNA	single-stranded DNA (jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina)
SVM	sequence variable mosaic
PMU	potential mobile units
REP	repetitive extragenic palindromes
DAPI	4'-6-diamino-2-fenylindol
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
SEM	skanovací elektronová mikroskopie
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay (enzymová imunosobrční analýza)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RFLP	Restriction fragment length polymorfism (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)
dNTP's	nukleosid trifosfáty
ddNTP's	dideoxynukleosid trifosfáty
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool