

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Detekce fytoplazem pomocí DNA-mikročipu

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ondřej Lenz Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.

Autor: Bc. Jaroslava Marková

České Budějovice, duben 2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská

Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava MARKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z12728**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**  
Název tématu: **Detekce fytoplazem pomocí DNA-mikročipu**  
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce: Jako základ bude na počátku práce sloužit DNA-mikročip vyvinutý na odd. rostlinné virologie ÚMBR. Úkoly diplomantky budou sestávat zejména z:

- 1) Izolace DNA/RNA fytoplazem z přírodních i sbírkových izolátů, včetně vzorků z hmyzích vektorů.
- 2) Optimalizace PCR (včetně návrhu nových primerů a případné multiplex PCR) tak, aby bylo možno připravit vzorky na DNA-mikročip v jednom kroku (v současné době je nutno použít 2 oddělené PCR).
- 3) Sekvenování a analýza sekvencí, návrh nových vhodných proub na mikročip.
- 4) Hybridizace vzorků na mikročip, analýza výsledků, vyhodnocení úspěšnosti jednotlivých proub a návrh nových proub dle získaných výsledků. Detekce fytoplazem v uměle připravených směsných infekcích.
- 5) Vypracování magisterské diplomové práce dle pokynů uvedených níže.

Zásady pro vypracování práce:

- úvod: obsahuje a) přiměřenou literární rešerši dané problematiky, b) cíle práce a c) stručné zhodnocení významu práce v dané problematice. Literární rešerše zmiňuje používané molekulární metody pro detekci fytoplazem a jejich srovnání s detekcí pomocí DNA-mikročipů. Popisuje aktuální stav výzkumu a výhody a nevýhody použití DNA-mikročipů.
- materiál a metody: popis metodiky práce: sběr/získání vzorků, izolace DNA, návrh primerů a proub na DNA-mikročip, podmínky značící PCR, hybridizace na DNA-mikročip, scann DNA-mikročipů a analýza výsledků.
- výsledky: optimalizovaná PCR (popř. multiplex-PCR), porovnání úspěšnosti nově navržených primerů, srovnání úspěšnosti jednotlivých proub na mikročipu (původní i nově navržené), úspěšnost detekce jednotlivých 16Sr-skupin fytoplazem pomocí DNA-mikročipu, detekce fytoplazem v uměle směsné infekci. Zpracování výsledků do obrázků, tabulek, grafů.
- diskuze: porovnává danou metodu s ostatními molekulárními metodami detekce fytoplazem, posuzuje možnost praktického využití metody, její výhody, nevýhody, obsahuje doporučení dalšího postupu.
- závěr: stručné shrnutí nejdůležitějších dosažených výsledků a možností dalšího postupu.
- seznam použité literatury: řazené abecedě v jednotném formátu dle příslušných mezinárodně platných norem.
- obsah: seznam kapitol a odpovídajících stran.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

**Phytoplasmas : genomes, plant hosts and vectors /ed. by Phyllis G. Weintraub, Phil Jones. Wallingford: CABI, 2010**

**Rešerše z databází: Web of Science, SCOPUS**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.**

BC AVČR ÚMBR

Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

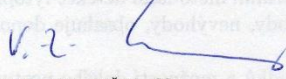
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

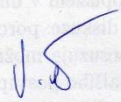
Datum zadání diplomové práce: **28. března 2013**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2014**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13 ④  
370 02 České Budějovice

L.S.

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.  
děkan

  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. března 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci na téma Detekce fytoplazem pomocí DNA-mikročipu 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 diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25. dubna 2014

Bc. Jaroslava Marková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Mgr. Ondřeji Lenzovi, Ph.D za trpělivost, podporu i cenné rady a připomínky při vytváření této práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D a kolektivu laboratoře rostlinné virologie za celkovou podporu. V neposlední řadě patří můj dík rodině a blízkým, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

## **Souhrn:**

Cílem práce bylo optimalizovat metodu detekce fytoplazem pomocí DNA-mikročipu. To zahrnovalo vhodnou metodu izolace genetického materiálu fytoplazmy, vývoj a optimalizaci PCR k namnožení různých skupin fytoplazem, optimalizaci detekce DNA na mikročipu a analýzu sekvencí fytoplazem k návrhu potenciálních lepších prób. PCR byla optimalizována pro sbírkové izoláty, poté i pro přírodní vzorky. Od všech zástupců 16Sr skupin sbírkových izolátů se podařilo získat sekvence a detekovat v nich fytoplazmu pomocí hybridizace. U přírodních vzorků se podařilo detekovat fytoplazmu ve vzorcích řepky olejky (*Brassica napus*), jetele lučního (*Trifolium pratense*), třapatky nachové (*Echinacea purpurea*) a jabloně domácí (*Malus domestica*). V DNA z hmyzích vektorů to bylo pouze u jediného vzorku s označením 202/6 ze skupiny 16Sr-XII. Sekvence jetele lučního a řepky olejky se shodují s databázovými vzorky skupiny 16Sr-I „*Aster yellows*“.

**Klíčová slova:** fytoplazma, polymerázová řetězová reakce, reverzní transkripce, DNA-mikročip

**Summary:**

The aim of this thesis was to optimize the method of detection of phytoplasmas using DNA-microarray. It consisted of testing an appropriate method of genetic material isolation, development and optimization of PCR to amplify different groups of phytoplasmas, optimization of detection of DNA at a microarray, and sequence analysis of phytoplasma in order to design more suitable probes. PCR was first optimized for collection isolates, then also for natural samples. All 16Sr groups from the collection were sequenced and phytoplasmas were detected in them by hybridization. Phytoplasmas were detected also in natural samples: oilseed rape (species *Brassica napus*), red clover (*Trifolium pratense*), purple coneflower (*Echinacea purpurea*), and apple tree (*Malus domestica*). Using the DNA from insect vectors, only sample 202/6 from the group 16Sr-XII was positive. The sequence of red clover and oilseed rape correspond with the database samples in the group 16Sr-I "Aster yellows".

**Keywords:** phytoplasma, polymerase chain reaction, reverse transcription, DNA-microarray

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Literární přehled</b> .....	<b>11</b>
2.1 Charakteristika fytoplazem .....	11
2.2 Detekce a identifikace fytoplazem .....	14
2.3 Amplifikační metody analýzy nukleových kyselin .....	16
2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	16
2.3.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (~ real-time PCR) .....	17
2.4 Hybridizační metody analýzy nukleových kyselin .....	19
2.4.1 DNA mikročipy (angl. „DNA microarrays“) .....	19
<b>3. Cíle práce</b> .....	<b>28</b>
<b>4. Materiál a metody</b> .....	<b>29</b>
4.1 Vzorky .....	29
4.1.1 Izolace DNA a RNA .....	29
4.2 Reverzní transkripce .....	29
4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	30
4.4 Kontrolní elektroforéza v agarózovém gelu .....	32
4.5 Purifikace PCR fragmentů a sekvenování .....	32
4.6 Hybridizace.....	33
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>34</b>
5.1 Příprava hybridizujících sekvencí .....	34
5.2 Detekce fytoplazem z celkové RNA .....	38
5.3 Sekvenování a analýza sekvencí .....	40
5.4 Hybridizace.....	41
5.4.1 Vyhodnocení a návrh prób .....	45
<b>6. Diskuze</b> .....	<b>46</b>
<b>7. Závěr</b> .....	<b>49</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	<b>51</b>
<b>9. Přílohy</b> .....	<b>58</b>



9.1	Seznam použitých zkratk	59
9.2	Roztoky a chemikálie	61
9.3	Tabulky	62
9.4	Sekvenování	66
9.5	Elektroforetické snímky	68
9.6	Hybridizace	69

## 1. Úvod

Fytoplazmy způsobují, spolu s viry a viroidy, značné škody ve výnosu a kvalitě rostlin, následně i jejich produktů (Hadidi *et al.* 2004). Jsou zodpovědné za celou řadu chorob významných plodin po celém světě. Některé z nich, zejména choroby dřevin, jsou pro rostliny letální (Weintraub a Jones, 2010). Konkrétně jsou spojovány s onemocněními více než tisíce druhů rostlin z 98 čeledí. Geograficky jsou fytoplazmy rozšířeny nejméně do 85 zemí (Gasparich, 2010) a očekává se další šíření do chladnějších oblastí z důvodu globálního oteplování (Oshima *et al.*, 2013).

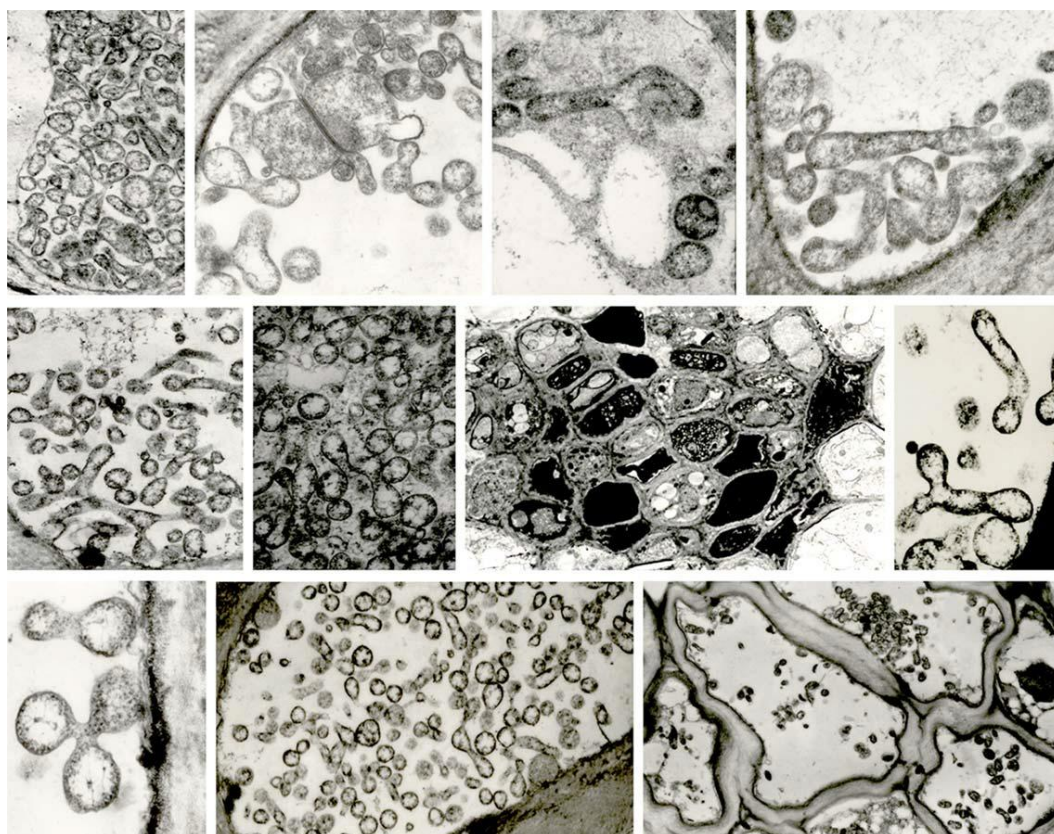
Zeměpisné rozšíření a důsledek onemocnění závisí na hostitelských rostlinách, stejně tak jako na chování hmyzích vektorů. Některé fytoplazmy jsou hojně rozšířeny díky širokému spektru hostitelských rostlin a polyfágním vektorům (jsou schopni přijímat potravu z celé řady rostlin). Např. *Candidatus Phytoplasma Asteris* je spojována s více než 80 druhy rostlin. Experimentálně je přenosná více než 30 druhy hmyzu na více než 200 druhů rostlin (Firrao *et al.*, 2007, Weintraub a Jones, 2010). Většina fytoplazem však napadá pouze omezený okruh rostlin a využívá jen oligofágní nebo monofágní vektory, což snižuje jejich rozšíření (Weintraub a Jones, 2010). Určitý druh rostlin může být příležitostně infikován i více než jedním typem fytoplazem. Dále bylo prokázáno, že jedna rostlina může být infikována jedním klíčovým typem fytoplazmy a zároveň jednou nebo více typy fytoplazem, které jsou přítomny v nižších titrech. Tato koinfekce (současná infekce dvěma popř. více druhy choroboplodných zárodků) může přispět k výměně genetické informace a k vývoji nových kmenů (Gasparich, 2010).

Fytoplazmy představují značné riziko v obtížné detekci a identifikaci (Hadidi *et al.*, 2004). První diagnostické metody byly závislé na charakterizaci symptomů a pozorování fytoplazem v ultratenkých řezech tkání nemocných rostlin elektronovým mikroskopem (Gasparich, 2010). V současné době se využívá řada molekulárně biologických metod, např. imunologické, hybridizační nebo amplifikační. Jejich nevýhodou je, že pomocí jednoho takového testu obvykle detekujeme pouze jednoho patogena. Rychle a simultánně lze stanovit až stovky patogenů pomocí DNA- mikročipů, se kterými Vás blíže seznámím na následujících stránkách.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy (rod ‘*Candidatus Phytoplasma*’) jsou drobné bakterie bez buněčné stěny z třídy Mollicutes. Doi *et al.* (1967) pozorovali pomocí elektronového mikroskopu v buňkách aster oválné útvary podobné živočišným mykoplazmám, odtud dříve známý název MLO’s - mycoplasma-like organism (mykoplazmám podobné organismy). Jsou obklopeny jednoduchou (trojvrstevnou) membránou a jejich specifické životní nároky neumožňují kultivaci *in vitro*. V jednotlivých průřezech vzorků TEM (transmisní elektronová mikroskopie) se jeví jako pleomorfní kulovité bakterie (obr. 1) o velikosti 200 – 800 nm (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008). Některé další studie dokazují vláknitý tvar. Např. Haggis a Sinha (1978) pozorovali krátké, rozvětvené, vláknité formy v SEM (skanovací elektronová mikroskopie), v preparátech z mrazového lámání.



**Obrázek 1:** Snímky řezů sítkovic z rostlin napadených fytoplazmami. Foceno při různých velikostech transmisním elektronovým mikroskopem. Patrné jsou pleomorfní tvary fytoplazem. Převzato z Bertaccini 2007.

V rostlinách se fytoplazmy nacházejí ve floému - vodivém pletivu specializovaném pro transport živin. Občas se vyskytují i v buňkách lýkového parenchymu (zajišťují transport živin na krátké vzdálenosti) (Weintraub a Jones, 2010).

Primárně jsou přenášeny sajícím hmyzem z řádu Hemiptera, který zahrnuje čeled' křísovitých (obr. 2a) (Cicadellidae), svítilek (Fulgoromorpha) a merovitých (Psyllidae) (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008). Po nákaze vektorů procházejí fytoplazmy stěnou trávicího traktu do hemolymfy, následně do buněk slinných žláz, kde se množí. Inkubační doba je 10 dnů až 3 týdny. Právě tehdy napadají další tkáně. Takto infikovaný hmyz saje na nových hostitelských rostlinách a spolu se slinami je přenáší do lýka (Oshima *et al.*, 2013). Pro některé hmyzí hostitele mohou být fytoplazmy patogenní, ale na většinu vektorů nemají negativní vliv. Ve skutečnosti mohou zvyšovat plodnost a ovlivňovat jejich chování (létání; preference druhů rostlin, kterými se živí) (Hogenhout *et al.*, 2008).

Ve víceletých rostlinách a infikovaných vektorech mohou fytoplazmy přezimovat. Šíření a průběh onemocnění jsou obvykle ovlivněny hustotou inokula a přítomností vektorů. Dále se mohou šířit vegetativním množением (řízky, hlízy, oddenky, cibule). Mechanicky jsou prakticky nepřenositelné. Nepřenáší se ani semena rostlin a vajíčky hmyzu (Christensen *et al.*, 2005, Weintraub a Jones, 2010). Rostliny napadené fytoplazmou vykazují řadu specifických a nespecifických příznaků, které poukazují na hluboké narušení normální rovnováhy růstových regulátorů (Bertaccini, 2007, Hogenhout *et al.*, 2008). Nicméně přesné mechanismy podílející se na rozvoji těchto příznaků a jejich řídicích genů stále nejsou dostatečně prostudovány. Mezi specifické příznaky (2b, 2c) patří **virescence** – výskyt zeleného zbarvení (obvykle způsobený tvorbou chlorofylu) v částech, které normálně zelené nejsou, zejména u květních obalů, **fyloidie** – změna květních orgánů na struktury podobné listu (angl. „phyllody“) a další abnormality, které vedou k neplodnosti rostlin, **metlovitost** (abnormální proliferace – zmnožování – výhonů) – dochází ke ztrátě apikální dominance (angl. „witches' broom“), zkracování nebo prodlužování internodií, zvětšené palisty a hnědé zbarvení floémové tkáně. K méně specifickým příznakům, které se běžně vyskytují hlavně u dřevin, patří žloutnutí a červenání listů, svinutka, nekrózy, předčasné podzimní zbarvení a předčasná defoliace, řídké olistění, odumírání, zakrnění celkového růstu a úbytek rostlin. Ve vzácných případech se příznaky vůbec nemusejí projevit nebo může dojít k jejich dočasnému či trvalému zmírnění (Andersen, *et al.*, 2013, Weintraub a Jones, 2010, Kůdela a Braunová, 2007). Mohou se lišit v závislosti na druhu

fytoplazmy, druhu hostitelské rostliny, stáří rostliny v době infekce a odlišných environmentálních podmínkách. V neposlední řadě se podílí na vývoji choroby řada faktorů, jako je koncentrace a virulence patogena nebo produkce toxinů. (Weintraub a Jones, 2010).



**Obrázek 2: Hostitelé fytoplazem;** a) vektor z čeledi křísovitých (Cicadellidae); b) třapatka nachová (*Echinacea purpurea*) infikovaná fytoplazmou ze skupiny 16Sr-IX-C; c) jetel luční (*Trifolium pratense*) infikovaný fytoplazmou ze skupiny 16Sr-I; Zdroje: a) a, b) převzato z: Strauss, 2009; c) foto autorky, 2012.

Fytoplazmový genom se skládá z jednoho chromozomu a několika plazmidů s unikátním genem pro replikaci. Chromozom je velmi malý (680-1,600 kb) a má nízký obsah guaninu a cytosinu (21 - 28 %). Právě takové genomy parazitárních a/nebo symbiotických bakterií jsou složeny převážně z funkčních genů (geny pro replikaci DNA, transkripci, translaci a translokaci bílkovin). V metabolických drahách jsou často patrné zásadní rozdíly, které se odrážejí ve způsobu života a postupném vývoji patogena. Ztráta jednotlivých genů je způsobena s největší pravděpodobností tím, že mnoho metabolitů je k dispozici v hostitelské buňce. Fytoplazmy nemají geny pro enzymy citrátového a pentózového cyklu, biosyntézu sterolů, mastných kyselin, většiny aminokyselin a nukleotidů (*de novo*). Místo toho mají více kopií genů pro transportní mechanismy, což naznačuje vysokou závislost na složkách metabolismu svého hostitele (Oshima *et al.*, 2013; Bertaccini, 2007, Hogenhout *et al.*, 2008). Ve srovnání s příbuznými mykoplazmami chybí fytoplazmám několik rekombinantních a DNA modifikujících funkcí. Místo toho se v genomu nachází velké množství repetitivních uspořádaných do velkých klastrů potenciálních mobilních jednotek (PMU, z angl. „potential mobile unit“). PMU umožňují vytvoření variability genomu a snazší komunikaci s prostředím (Bai *et al.*, 2006).

Fytoplazmy mají cca 500 – 840 genů a přibližně 40-50 % z nich kóduje hypotetické proteiny (jejich funkce zatím nebyla prokázána). Všechny dosud osekvenované genomy obsahují gen *sodA* kódující protein, který může inaktivovat ROS - reaktivní formy kyslíku (Oshima *et al.*, 2013, Weintraub a Jones, 2010). Právě jednou z prvních odpovědí buňky po úspěšném rozpoznání patogena je produkce ROS v tzv. oxidativním vzplanutí, kdy dochází ke zvýšené spotřebě kyslíku a tvorbě kyslíkových radikálů, které mají výrazné bakteriocidní účinky (Torres, 2006). Vzhledem k tomu, že mykoplazmy gen *sodA* neobsahují, může právě on pomáhat fytoplazmám proti obraně rostlinné buňky pomocí ROS (Oshima *et al.*, 2013).

## 2.2 Detekce a identifikace fytoplazem

Detekce fytoplazem se více než 20 let spoléhala pouze na mikroskopické pozorování, především na fluorescenční (DAPI, 4'-6-diamidino-2-fenylindol tj. fluorescenční barvivo, které se pevně váže na DNA) a elektronovou mikroskopii ultratenkých řezů rostlinných pletiv.

Na počátku 80. let 20. století byly připraveny první polyklonální protilátky proti různým fytoplazmovým antigenům. Bylo ale obtížné čištění jednotlivých antigeních frakcí. Po překonání úskalí purifikace byly připraveny protilátky pro různé taxonomické skupiny, které jsou velmi účinné v imunisorpční elektronové mikroskopii (ISEM), fluorescenční mikroskopii, western blotu a v ELISA testech (enzymová imunisorpční analýza, z angl. „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“). I přes značné úsilí ale vykazují testy křížové reakce s různými skupinami nebo dokonce pozitivní reakce se zdravými kontrolními rostlinami (Firrao *et al.*, 2007). Pro vybrané skupiny - fytoplazmovou žloutenku aster (AY – Aster yellows) (Lin a An Chen, 1985), fytoplazmovou žloutenku prvosenek (Clark *et al.*, 1989), zlaté žloutnutí révy (FD - flavescence dorée) (Seddas *et al.*, 1996), proliferaci jabloně (AP – apple proliferation) (Loi *et al.*, 2002), žlutou zakrslost rýže (RYD - Rice yellow dwarf) (Chang *et al.*, 1995), stolbur rajčete a fylodii jetele (Garnier *et al.*, 1990) - byly z těchto důvodů připraveny specifické monoklonální protilátky. Komerčně dostupné jsou ELISA testy pro diagnostiku ekonomicky významných onemocnění FD a AP. Sérologické metody jsou snadnou a levnou variantou pro masový screening vzorků. Nevýhodou je jejich špatná citlivost u vzorků s nízkým titrem patogenů (Firrao *et al.*, 2007).

Dnes se fytoplazmy běžně detekují technikami založenými na analýze nukleových kyselin (NK). V devadesátých letech byly naklonovány první fytoplazmové DNA sondy (náhodně klonovaná DNA nebo komplementární RNA). Na základě těchto naklonovaných fragmentů byly získány specifické primery pro konkrétní druhy fytoplazem. K detekci celého spektra fytoplazem jsou navrhovány nespecifické primery do konzervovaných oblastí (např. 16S rRNA, ribozomální protein, Tuf gen, 16S - 23S spacer). Dosud známé fytoplazmy jsou běžně rozlišitelné pomocí RFLP analýzy genu 16S rRNA za použití řady restričních enzymů (RFLP z angl. „**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism“, polymorfismus délky restričních fragmentů). Na základě získaných restričních map, charakteristických pro danou skupinu, lze identifikovat neznámé fytoplazmy. (Firrao *et al.*, 2007; Bertaccini a Duduk, 2009). Problémem přímé amplifikace je nízká koncentrace fytoplazmové DNA. Té je většinou v DNA extrahované z tkáně méně než 1 %. Speciální protokoly izolace se zabývají snižováním obsahu polyfenolických a polysacharidových inhibitorů, které mohou bránit průběhu reakce. Citlivost a specificita detekce se zvyšuje také pomocí „nested“ PCR. Cílem této metody je připravit DNA-fragment dostatečného množství a odpovídající čistoty. Snahou dalších výzkumů je získat rychlou, spolehlivou a ekonomicky výhodnou techniku bez nebezpečí falešně pozitivních výsledků. (Bertaccini a Duduk, 2009). V současné době se k přesné kvantifikaci a efektivní detekci využívá real-time PCR. V porovnání s „nested“ PCR je vysoce citlivá a výsledek není nutné elektroforeticky hodnotit. Tím je také méně náchylná ke kontaminaci ampliconů a pracovních ploch (Christensen *et al.*, 2012).

K dalšímu porozumění biologie a patogenity přispívá sekvenování a následná analýza genomů. V současné době je zveřejněno pět kompletně osekvenovaných fytoplazmových genomů. Jedná se o kmeny Onion Yellows M a Aster yellows witches'-broom patřící do ribozomálních podskupin 16Sr-I-B a I-A, dále pak kmeny „*Candidatus* Phytoplasma australiense“ (16Sr-XII) (podskupina tuf-Australia; rp-A) a „*Candidatus* Phytoplasma mali“ (16Sr-X). V roce 2013 k nim přibyl kmen „Strawberry lethal yellows phytoplasma“ patřící do ribozomální skupiny 16Sr-XII (Weintraub a Jones, 2010; Andersen, *et al.*, 2013).

Hlavním problémem ve vývoji vysoce výkonných, spolehlivých metod pro detekci fytoplazem je obtížné získání reprezentativních extraktů nukleových kyselin. Příčinou je velmi nepravidelná distribuce fytoplazem v infikovaných rostlinách. Nejspolehlivější metodiky proto zahrnují sběr a následné testování dílčích vzorků z různých částí individuálních rostlin. Diagnostické postupy získané za posledních

15 let se dnes běžně používají a jsou vhodné k detekci onemocnění v rostlinném rozmnožovacím materiálu a k identifikaci vektorů, čímž se zabrání šíření a ekonomickým ztrátám (Firrao *et al.*, 2007).

## 2.3 Amplifikační metody analýzy nukleových kyselin

Molekulárně biologické metody diagnostiky patogenů nemusí být vždy dostatečně citlivé, obzvláště dochází-li při izolaci nukleových kyselin ke ztrátám. Proto se hledal vhodný způsob, jak i sebenepatrnější obsah nukleové kyseliny namnožit, tak aby byl dobře detekovatelný zvolenou technikou. Řešením se staly amplifikační metody založené na polymerázové řetězové reakci (Pavlík, 2002).

### 2.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla jako laboratorní technika koncipována K. Mullisem v roce 1983 v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii. K technickému provedení PCR, jak ho známe dnes, vedla dlouhá a nesnadná cesta vývoje (Pavlík, 2002). PCR umožňuje vytvářet kopie vybraného úseku DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (ve směru 5'→3'). Každá nově nasyntetizovaná molekula DNA se stává předlohou pro vznik dalších, čímž se daný úsek exponenciálně namnoží – amplifikuje (řádově desítky až stovky miliard kopií).

**Základní složky PCR** (převzato z: Marková, 2011):

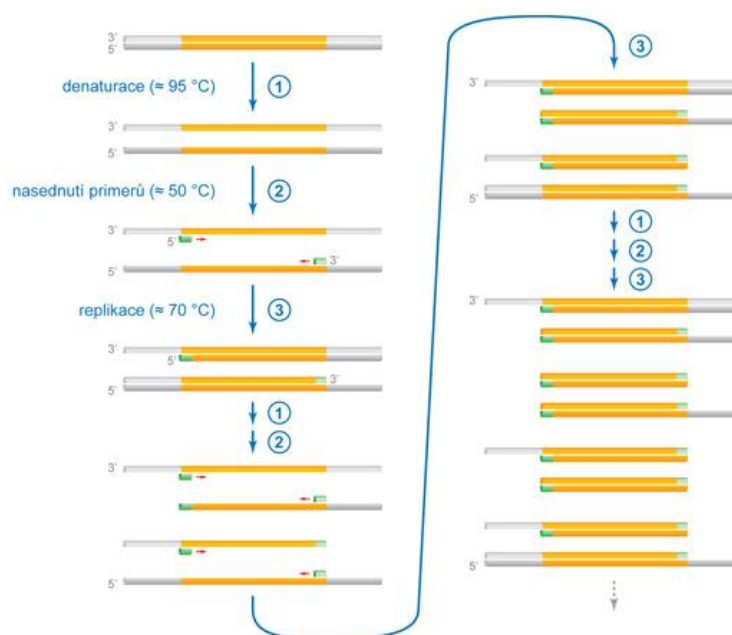
- **Původní molekula DNA**, která má být kopírována (templát).
- K zahájení syntézy DNA jsou potřebné **dva primery**. Jedná se o krátké úseky ssDNA (single-stranded DNA; jednořetězová deoxyribonukleová kyselina), které ohraničují oba konce cílové sekvence. Obvykle mají primery 15-20 bází, delší primer je více specifický pro vazbu k přesné cílové sekvenci.
- 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.
- K vytvoření nové DNA potřebuje polymeráza **nukleotidy**. Ty jsou dodávány ve formě nukleosid trifosfátů (dNTP's).



Celý proces amplifikace lze rozdělit na tři teplotně odlišné kroky (obr. 3):

1. Denaturace ds DNA při 92 – 96 °C.
2. Annealing: teplota klesne na 45 – 65 °C (dle chemického složení primerů) a primer se komplementárně naváže k původnímu vláknku.
3. Prodlužování dceřiného řetězce od ukotvených primerů při teplotě 72 °C za použití dNTPs.

K vyhodnocení klasické PCR se používá gelová elektroforéza, při níž se jednotlivé fragmenty rozdělí podle velikosti.



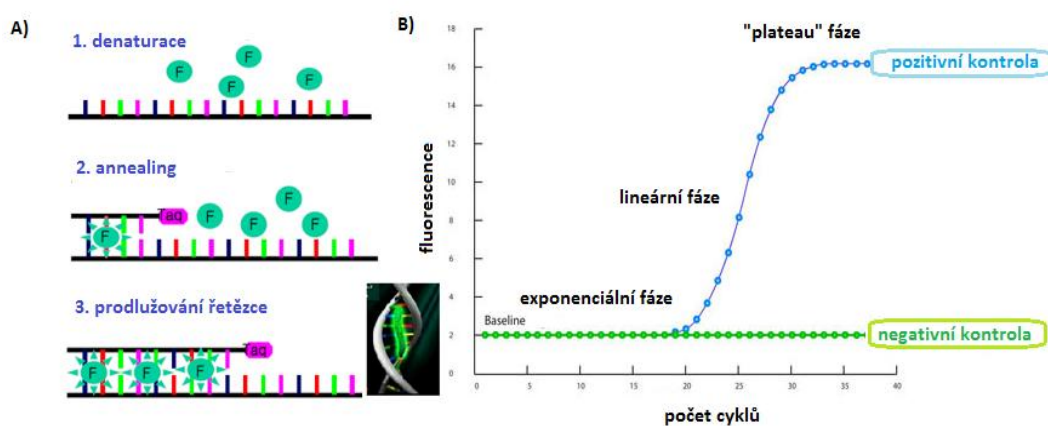
**Obrázek 3:** Schéma PCR. ① denaturace ds DNA (žlutě vyznačená cílová sekvence), ② nasedání primerů (vyznačeny zeleně), ③ prodlužování řetězce (směr vyznačen červenými šipkami). Převzato z: Kодиček, 2007

### 2.3.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (~ real-time PCR)

Ve snaze zvýšit rychlost a citlivost detekčních metod byla vyvinuta real-time PCR. Ta je založená na klasické PCR a přírůstky nově vzniklých ampliconů jsou kontinuálně sledovány během každého cyklu fluorescenčními detekčními technikami (Weintraub a Jones, 2010). Fluorescenční signál je automaticky zaznamenáván přístrojem do křivek (obr. 4B), které jsou následně analyzovány. Základní podmínkou je přítomnost specifického nebo nespecifického fluorescenčního substrátu (detekční sonda), který se váže na syntetizovanou DNA (Šťásková *et al.*, 2012). Specifickou sondou rozumíme fluorescenčně značenou synteticky připravenou krátkou sekvenci nukleotidů komplementární k hledanému úseku DNA. Hybridizací studovaného vzorku

se sondou, která je následně štěpena polymerázou během prodlužování řetězce, dochází k nárůstu fluorescence. Nеспецифická sonda, jakou je např. SYBR green (obr. 4A), se váže náhodně do ds DNA (Demnerová, 2012). Množství fluorescence je úměrné logaritmu koncentrace cílové sekvence. Výhodou metody oproti klasické PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu. Kvantifikace může být jednak relativní, tj. porovnání s jinou skupinou vzorků (kontrolní vzorky apod.), jednak absolutní, tj. výpočet z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství. Při hodnocení platí skutečnost, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku, tím rychlejší je přírůstek fluorescence (Šťástková *et al.*, 2012).

Mezi studované vzorky je potřeba zařadit i několik kontrolních vzorků, tedy pozitivní a negativní kontroly (obr. 4B). Pozitivní kontrolou jsou většinou housekeepingové geny. To jsou geny pro zachování základních funkcí příslušného organismu a mají ve sledovaných vzorcích stále stejnou expresi (Čížková, 2005).



**Obrázek 4: Real-time PCR.** A) Nеспецифické značení sondou „SYBR green“ (F), která se vmezeřuje do ds DNA. Převzato z: Bioneer corporation, 2011; B) Křivka nárůstu fluorescence pozitivní a negativní kontroly. **Baseline:** první cykly PCR s nízkým fluorescenčním signálem nad pozadím. **Exponenciální fáze:** teoretické zdvojnásobení produktu tvoří exponenciální růst signálu. **Lineární fáze:** množství reaktantů se začíná snižovat a účinnost reakce klesá. **„Plateau“ fáze:** reaktanty byly vyčerpány. Reakce nemůže produkovat další fluorescenční signál. Převzato z Abbott molecular, 2014.

## 2.4 Hybridizační metody analýzy nukleových kyselin

Tradiční hybridizační testy byly vyvinuty v 70. letech 20. století. Jsou zkonstruovány pružnými nitrocelulózovými nebo nylonovými membránami a většinou jsou radioaktivně značeny. Jejich paralelní, moderní verze jsou DNA mikročipy využívající pevných podkladů a fluorescenčního značení a detekce. Zásadní převrat biologické analýzy představuje i miniaturní formát mikročipu (Scheda, 2000).

### 2.4.1 DNA mikročipy (angl. „DNA microarrays“)

Poprvé byly DNA mikročipy charakterizovány v roce 1995. Sloužily pro analýzu rozsáhlých modelů exprese několika genů. Od té doby byly aplikovány do mnoha oblastí biologického výzkumu. Dnes se mimo jiné využívají v diagnostice, genomice (sekvenování, analýza exprese genů, mapování polymorfismů – SNP, z angl. „Single Nucleotide Polymorphism“ – jednonukleotidový polymorfismus) farmakologii nebo ve výzkumu rakoviny a dalších biomedicínských oborech (Hadidi *et al.*, 2004).

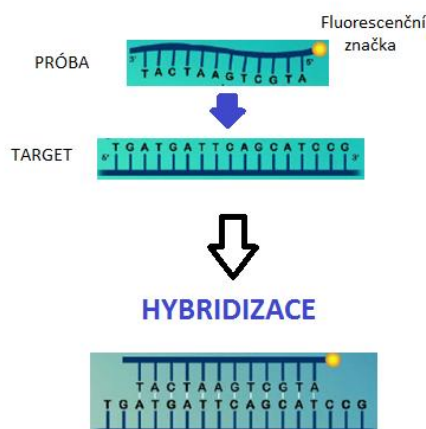
Základem mikročipů jsou biomolekuly (DNA, RNA, proteiny) umístěné ve známém uspořádání na pevném podkladu (angl. „glass slide“). Ten se podobá podložnímu sklíčku do optického mikroskopu (obr. 5). Pro jejich konstrukci mohou být využity různé nosiče, např. ze skla, křemíku, plastu nebo porcelánu. Vhodné jsou i mikrotitrační destičky či membrány. Na čiré sklo se nukleové kyseliny špatně váží. Z toho důvodu je povrch různě upravován. Jednou z možností je použití hydrofobních polymerů, např. Poly-L-lysin, aminosilan, epoxysilan apod. Sklo může být také ošetřeno fyziologickým roztokem, který se kovalentně váže na DNA-sondy. Tím zamezíme jejich odstranění při hybridizaci a následném promývání. K detekci radioaktivně značené nukleové kyseliny bývá sklo potaženo nylonovou membránou (Heller, 2002). Výhodou skleněných podkladů je odolný materiál, který snese vysoké teploty a promývací roztoky s vysokou koncentrací solí. Je neporézní, DNA může být kovalentně navázána přímo na speciálně ošetřený povrch. Sklo má nízkou fluorescenci, čímž nijak nepřispívá k tzv. „šumu“ na pozadí (Cheung *et al.*, 1999).

Analogie s počítačovými čipy, ve kterých je na malou plochu směřováno mnoho prvků mikroprocesoru, je v tom, že lze na takto malou plochu pevného podkladu vedle sebe připravit různé sondy. Na ploše 10 až 500  $\mu\text{m}$  může být od 100 do 1 000 testovacích míst. Sondy jsou připraveny ke zvolenému povrchu kovalentně nebo nekovalentně. Sondami mohou být buď syntetické oligonukleotidy, produkty PCR nebo větší fragmenty DNA/RNA. (Heller, 2002; Čížková, 2005).



Obrázek 5: Příklad DNA mikročipu (Převzato z: <http://www.bioexpress.com>)

DNA mikročipy jsou založeny na párování komplementárních bází (A-T a C-G pro DNA; A-U a C-G pro RNA). Tato specifická vazba umožňuje hybridizovat cílovou DNA/RNA (angl. „target“) k sondě (obr. 6).



Obrázek 6: Schéma hybridizace. Hybridizující sekvence (angl. „target“) DNA se na základě komplementarity bází „přilepí“ k fluorescenčně značené **próbě** (Zdroj: autorka)

Samotný experiment se skládá ze čtyř základních laboratorních kroků:

- 1) Příprava vzorků a jejich značení
- 2) Hybridizace
- 3) Promývání – odstranění přebytku vzorku
- 4) Získání a následná analýza obrazu

Pro hybridizaci na čipu potřebujeme značenou DNA (popř. cDNA). K jejímu získání jsou klíčové následující kroky izolace nukleové kyseliny, u RNA přepis, pomocí reverzní transkripce, do cDNA a následné značení (Čížková, 2005).

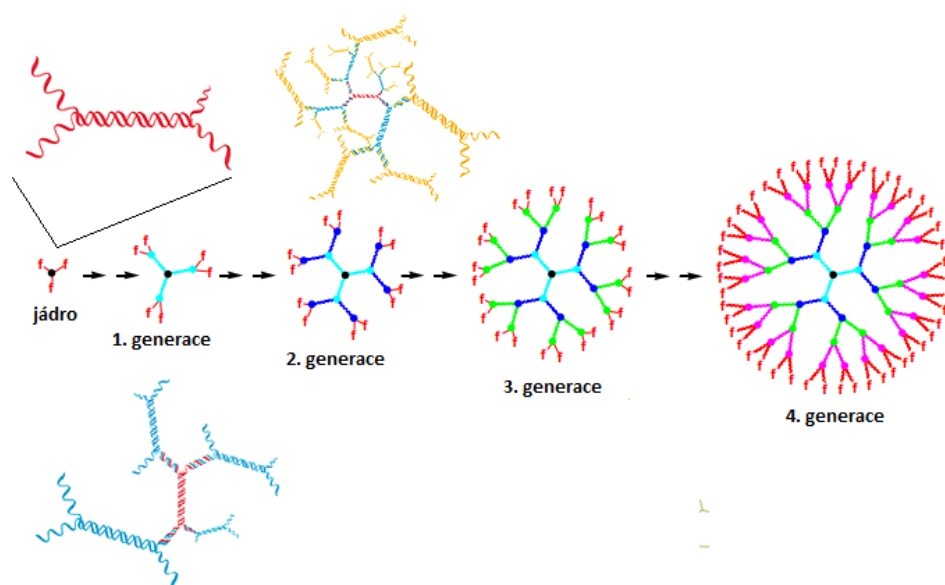
### **Značení hybridizujících sekvencí**

Před nebo po hybridizaci na čipu musí být vzorky vhodně označeny. Na výběr máme z několika druhů značení:

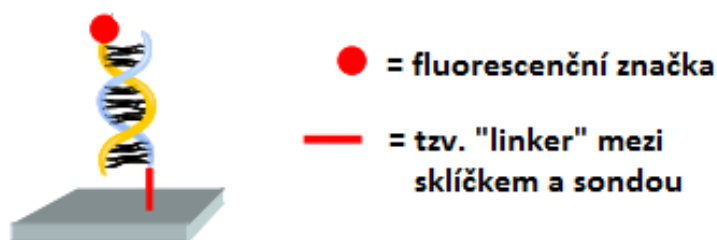
- **Přímé** – značené nukleotidy nebo primery jsou přímo zabudovány do vzorku např. v průběhu PCR
- **Nepřímé** – do vzorku jsou vkládány (též např. pomocí PCR) modifikované nukleotidy, na něž se dodatečně (po skončení PCR) váže fluorescenční barvivo
- **Dendrimerní** - systém není závislý na začleňování modifikovaných nukleotidů a může být použit i k zesílení signálu (viz dále)

### **Dendrimery**

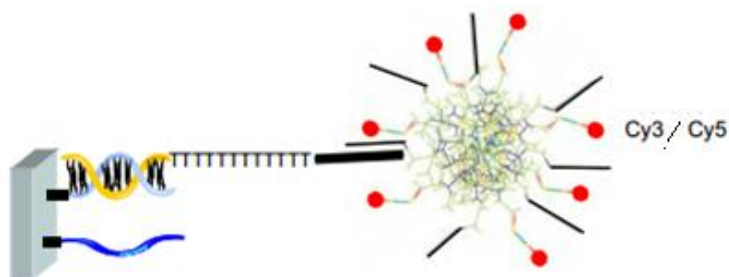
Dendrimery jsou rozvětvené syntetické vysokomolekulární až makromolekulární vrstvené polymery (obr. 7). Regulací syntézy lze přesně upravovat jejich molekulární hmotnost a chemické složení. (Lee *et al.*, 2005). V metodikách mikročipových testů mají dvojí využití. Buď mohou sloužit jako tzv. „linkery“ (spojují oligonukleotidové sondy s pevným podkladem mikročipu – obr. 8) nebo ke značení hybridizujících sekvencí. V prvním případě dendrimer umožňuje pohyb sondy daleko od povrchu sklíčka a snazší hybridizaci, ve druhém případě (obr. 9) zvyšuje citlivost testu, což umožňuje detekci malých množství biologických objektů (Caminade *et al.*, 2006).



**Obrázek 7: Schéma syntézy dendrimerů.** Červeně naznačeny funkční skupiny (f). Zdroj: Upraveno podle Caminade *et al.*, 2006 a The Genisphere (<http://genisphere.com/our-technology>) 2000.



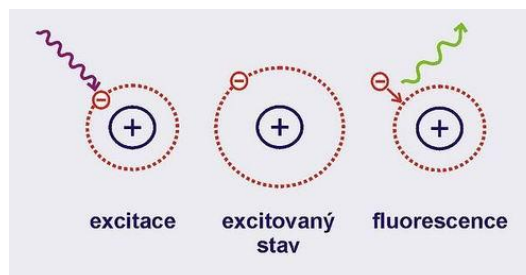
**Obrázek 8: Využití dendrimerů v mikročipových testech.** Žlutě naznačena hybridizující sekvence, červeně naznačeno umístění dendrimeru s funkcí „linkeru“ a dendrimeru jako značky. Zdroj: upraveno podle Caminade *et al.*, 2006.



**Obrázek 9: Příklad dendrimerního značení „3DNA® dendrimer“.** Značení odpovídá 45 fluorescenčním barvičkám (Cy3, Cy5) a obvykle se používá pro nepřímou detekci. Žlutě naznačena hybridizující sekvence, červeně fluorescenční barvivo (Cy3 nebo Cy5) Zdroj: upraveno podle Caminade *et al.*, 2006.

## Fluorescenční značení a fluorescence

Pro značení vzorků jsou nevhodnější a v dnešní době nejčastěji používaná fluorescenční barviva. Fluorescenční barvivo je barvivo, jehož molekuly jsou schopny fluorescence (viz obr. 10).

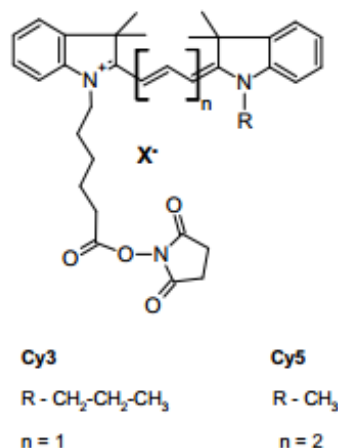


**Obrázek 10: Princip fluorescence.** **Excitace:** molekula ozařované látky absorbuje foton s energií, která se spotřebuje na převedení 1 vazebného elektronu ze základního stavu do stavu vyššího. **Excitovaný stav:** elektrony se pohybují kolem jádra ve větší vzdálenosti (nestabilní). **Fluorescence:** při návratu elektronu do základního stavu se energie opět vyzáří ve formě fotonu. Vlnová délka emitovaného světla (zelená šipka) je delší než vlnová délka světla, které fluorescence excitovalo (fialová šipka). Zdroj: Ústav biologie Lékařské fakulty (<http://biologie.upol.cz/metody>).

## Cyaninová fluorescenční barviva „CyDyes“

Barviva „CyDyes“ jsou nízkomolekulární cyaninová barviva obsahující fluorofor, který způsobuje fluorescence. Jedná se o funkční skupinu na bázi aromatických heterocyklických struktur obsahujících vždy jeden nebo více atomů dusíku, případně ještě atomy síry a kyslíku jako heteroatomy (např. pyrol, indol, imidazol, pyridin, chinolin a thiazol). Tyto struktury jsou spojeny methinovými můstky a dohromady vytváří systém konjugovaných dvojných vazeb (Vítámvás *et al.*, 2010).

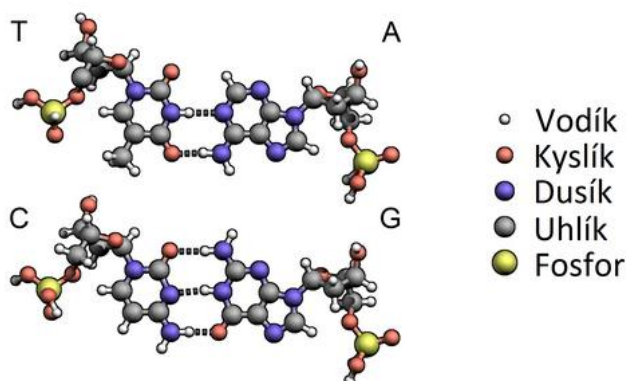
Nejpoužívanějšími fluorofory v molekulární biologii, tedy i pro analýzy pomocí DNA-čipů, jsou Cyanin 3 (Cy3) a Cyanin 5 (Cy5) (obr. 11). Tyto fluorofory vykazují efektivní kvantové výtěžky, přiměřenou fotostabilitu, jedinečná, nepřekrývající se, emisní a excitační spektra umožňující „multiplex“ analýzy (Müller a Nicolau, 2004). Cy3 emituje v červené oblasti viditelného světla (VIS) a je excitován zeleným laserem. Cy5 emituje v modré oblasti VIS a je excitován červeným laserem. Barviva jsou citlivá na světlo, proto se uchovávají v tmavých tubách. Při manipulaci s označenými vzorky a gely je třeba se vyvarovat jejich expozici na přímém světle (Vítámvás, *et al.*, 2010). Do biomolekul bývají začleňovány enzymaticky, nejčastěji pomocí reverzní transkripce, ligace nebo PCR (Müller a Nicolau, 2004).



**Obrázek 11: Strukturní vzorec cyaninového barviva.** Rozdíl mezi Cy3 a Cy5 barvičkami. Převzato z: Vítámvás, *et al.*, 2010

### Hybridizace

Hybridizovat (viz obr. 6) mohou pouze jednovláknové molekuly. Pokud pracujeme s dvouvláknovou nukleovou kyselinou, musíme před hybridizací tyto molekuly denaturovat. Řetězce jsou při sobě drženy vodíkovými můstky (obr. 12). Po překročení určité kritické teploty dochází k zániku těchto interakcí. Nejprve zaniká vazba A-T, která je uskutečňována pouze dvěma vodíkovými můstky. Později zaniká vazba G-C se třemi vodíkovými můstky. První denaturační procesy mohou nastat už při 50 – 60 °C, podle složení DNA. K úplné denaturaci ale dochází až při 94 – 96 °C (*Ústav biologie Lékařské fakulty; <http://biologie.upol.cz/metody>*).



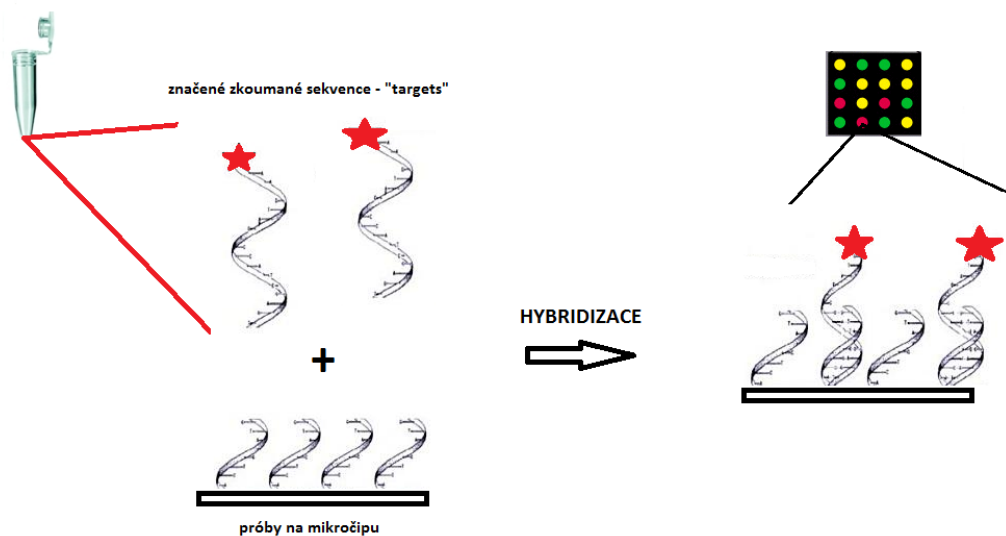
**Obrázek 12: Vodíkové můstky.** Interakce nastává u molekul, kde je atom vodíku vázán na silně elektronegativní prvek, s alespoň jedním volným (nevazebným) elektronovým párem. V případě nukleových kyselin to může být kyslík nebo dusík. Thymin (T) s adeninem (A) je spojen dvěma vodíkovými můstky, cytosin (C) s guaninem (G) třemi. (Upraveno podle: Wikipedia)



Při poklesu teploty pod teplotu tání dochází k obnovení vodíkových můstků procesem tzv. renaturace. Pokud jde o spojení dvou molekul, které spolu dříve spojeny nebyly, mluvíme o hybridizaci. Na vzniku a stabilitě vodíkových můstků se podílí kromě teploty i koncentrace iontů v prostředí. Podmínky hybridizace musí být dostatečně přísné, aby vznikaly jen přesně spárované molekuly (*Ústav biologie Lékařské fakulty; <http://biologie.upol.cz/metody>*).

Proces hybridizace na mikročipu (obr. 13) probíhá 16 až 24 hodin při 42 °C – 45 °C (cDNA sondy) nebo při 42 – 50 °C pro oligonukleotidové sondy. Sondou v molekulární biologii nazýváme nukleovou kyselinu, pomocí které vyhledáváme určitou sekvenci ve vzorku. Po hybridizaci se přebytek roztoku se vzorkem odstraní příslušnými pufrý s detergentem.

Mezi studované vzorky je nezbytné zařadit i několik kontrolních vzorků, tedy negativní a pozitivní kontroly, vzorky obsahující pouze roztok pro tisk (blank) a kotvy. Kotvy tvoří fluorescenčně značené oligonukleotidy, které fluoreskují i v případě, že na čip není hybridizována žádná DNA. Laboratorní část představuje přibližně jen 20 % experimentu. Další mnohem náročnější práce spočívá v analýze a vyhodnocení vzniklého hybridizačního vzoru pomocí počítačové techniky (Čížková, 2005).



Obrázek 13: Schéma hybridizace na mikročipu. Upraveno podle Stekel, 2003.

## **Detekce a následná analýza obrazu**

Vlastní hybridizační experiment je zakončen skenováním čipu a uložením získaného obrazu ve formě počítačového souboru. Technologie čipů tak poskytuje „zdrojová data“ ve formě obrazů, které je nutné následně analyzovat (Čížková, 2005). Analýza zahrnuje zpracování získaného obrazu, zhodnocení kvality surových dat a jejich filtrování, transformaci a normalizaci dat, statistické zpracování získaných dat a validaci výsledků.

Intenzita fluorescence je měřena laserem konfokálního mikroskopu (skeneru). Laserový zdroj se používá k excitaci fluorescence u fluorescenčně značené DNA. Fluorescenční obraz je získán excitačními a emisními filtry specifickými pro použité vlnové délky. Citlivost a dynamický rozsah značení závisí na detekčním systému. Existují fluorescenční skenery, které využívají červené a zelené lasery pro Cy3/Cy5 excitace. (Müller a Nicolau, 2004).

Získaný obraz se převede z grafického formátu do datového souboru softwarovým příložením mřížky na obraz. Následuje identifikace bodů a extrakce kvantitativních dat. Software přiřadí každému bodu jeho intenzitu a pomocí několika algoritmů se získají průměrné relativní intenzity fluorescence. Intenzity fluorescence se extrahují pro jednotlivé barvy odděleně, tj. ve více spektrech, kterým říkáme kanály (Čížková, 2005).

Dle počtu snímaných barev lze microarray experimenty rozdělit na:

- Jednakanálové (angl. „single channel“)
- Dvoukanálové (angl. „two channel“) – duální značení vzorků

Při duálním značení vzorků je možné přímo porovnat expresi sledovaného genu mezi vzorky, které jsou na jediném čipu.

Filtrování nespolehlivých spotů využívá statistické testy, variabilitu, průměr nebo SNR (z angl. „signal to noise ratio“) – poměr signálu spotu a směrodatné odchylky pozadí. Za nespolehlivé spoty se považují překrývající se spoty, spoty kontaminované prachem, se silným šumem pozadí, s netypickou velikostí a tvarem, saturované spoty nebo spoty, které se nenacházejí v očekávaných pozicích.

Nejsilnější stránkou DNA-čipů je rychlá simultánní detekce až tisíců jedinců pomocí jednoho testu. Takovéto systémy provádějící různé multiplex analýzy produkují ovšem obrovské množství dat, což je současně stránkou nejslabší.

Limitním faktorem může být detekce pouze těch variant sekvencí, které jsou na mikročipu natištěny.

### 3. Cíle práce

Cíle práce jsou sestaveny podle zadání do následujících bodů:

- 1) Izolace DNA/RNA fytoplazem z přírodních vzorků
- 2) Optimalizace PCR, příp. multiplex PCR, tak aby bylo možno připravit vzorky na DNA-mikročip nejlépe v jednom kroku
- 3) Sekvenování a analýza sekvencí
- 4) Hybridizace vzorků na mikročip, analýza výsledků, vyhodnocení úspěšnosti jednotlivých prób a návrh nových prób dle získaných výsledků
- 5) Detekce fytoplazem v uměle vytvořených směsných infekcích

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Vzorky

Pro práci byly použity sbírkové izoláty rostlinné DNA prof. Bertaccini z Itálie (viz tab. 11), přírodní vzorky z rostlin (viz tab. 13), ze kterých byla izolována celková DNA, případně RNA a izoláty DNA hmyzích vektorů prof. Navrátila z Olomouce (viz tab. 12). Z vybraných vzorků byly míchány umělé směsné infekce.

#### 4.1.1 Izolace DNA a RNA

Veškerá DNA byla izolována z odebraných rostlinných vzorků pomocí kitu **NucleoSpin® Plant II** (Macherey - Nagel, DE) a veškerá RNA byla izolována z vybraných rostlinných vzorků (viz tab. 13) pomocí kitu **RNeasy Plant Mini Kit** (Qiagen, NL) přesně podle přiložených návodů výrobců.

Všechny vzorky jsou uchovávány při -20 °C.

### 4.2 Reverzní transkripce

RNA má krátkou životnost a většina metod v molekulární biologii pracuje s DNA. Proto se pro další práci přepíše RNA do cDNA (~ DNA komplementární k mRNA – „messenger“ RNA). K přepisu byl použit kit **iScript cDNA Synthesis Kit** (Bio-Rad, Kalifornie, USA) s náhodnými hexanukleotidovými primery. Reakce byla připravena podle návodu (viz tab. 1) a probíhala za stanovených podmínek (viz tab. 2).

**Tabulka 1: Příprava reakční směsi pro reverzní transkripci.** (Množství uvedeno pro jednu reakci.)

reakční složka	množství [μl]
pufr	2
reverzní transkriptáza	0,5
vzorek RNA	7,5
	10

**Tabulka 2: Schéma teplotních podmínek pro reverzní transkripci kitem „iScript cDNA Synthesis Kit“**

teplota	čas
25 °C	5 min
42 °C	50 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

### 4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR slouží k selektivní amplifikaci vybraných oblastí molekuly DNA. V této práci byla reakce využita i pro značení hybridizující sekvence (angl. „target“). Značení probíhalo pomocí značených primerů, většinou primeru s orientací „reverse“. K získání specifických fragmentů z genů ribozomálních proteinů rps3, rpl22 a rp19 byly použity primery uvedené v tabulce 3.

**Tabulka 3: Primery pro amplifikaci a značení hybridizujících sekvencí (Autor: Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D., nepublikované údaje)**

název	sekvence	orientace	značení
rpS3 F1	TGGTGGGACATAAATTAGGTGA	forward	-
rpS3 F2	CGTTTATTTCCAAGAGCTAAAGG	forward	-
rpS3 Fc0	CCTCGAAAAGCACGTTTAGT	forward	-
rpS3 R1	TCCACCTAAACGACCTGAAA	reverse	Cy3
rpS3 Rd0	TACTTTAACTCCTAAAACCTCC	reverse	Cy3
rpS3 R4	GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	reverse	Cy3/Cy5
rpS3 F5	AATGCTGTTTCATAATTT	forward	-
rpS3 F6	AAATATTGAAGAAGCTCAAGC	forward	-
rpS3 F7	AAAGCACGTTTAGTTGTTGATTT	forward	-
rpS3 F8	GGACATAAGTTAGGTGAATTTTC	forward	-
rpS3 F8a	GGACATAAGTTAGGTGAATTTTC	forward	Cy3
rpS3 F8b	GGTTATAAATTAGGTTCTTTTGC	forward	Cy3
rpS3 R4_1	TATTTAGTTCTTTTTGGCATTAAACAT	reverse	Cy5
rpS3 F8as	CATAAGTTAGGTGAATTTTC	forward	-
rpS3 F8bs	TTATAAATTAGGTTCTTTTGC	forward	-
rpS3 F8bl	TAGGTTATAAATTAGGTTCTTTTGC	forward	-

Do reakční směsi byl použit **PPP Master Mix** (Top-Bio, ČR). Reakce byla namíchána podle návodu výrobce. Pro optimalizaci PCR bylo přidáváno různé množství hořčnatých iontů, 0 – 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$  a byla zkoušena různá teplota annealingu (viz tab. 4). Veškeré chemikálie byly během práce uchovávány v ledové tříšti. PCR probíhala v termocyleru (Peltier Thermal Cyler PTC-200) za definovaných teplotních podmínek (viz tab. 5).

**Tabulka 4: Příprava reakční směsi s PPP Master Mixem.** (Uvedeno množství pro jednu reakci.)

reakční složka	množství [ $\mu\text{l}$ ]
<b>2x PPP Master Mix</b>	10,0
<b>forward</b>	1,25
<b>reverse</b>	1,25
<b><math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	0,0 – 1,0
<b>templát DNA (cDNA)</b>	0,5
<b>RNase/DNase-free <math>\text{H}_2\text{O}</math></b>	6,0 - 7,0
	20,0

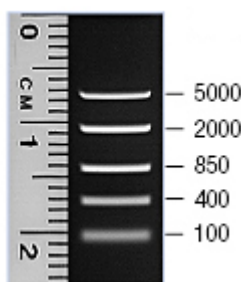
**Tabulka 5: Protokol teplot PCR.** PCR probíhala v termocyleru (Peltier Thermal Cyler PTC-200) za následujících teplotních podmínek.

	teplota	čas
<b>úvodní denaturace</b>	93 °C	3 min
<b>denaturace</b>	93 °C	30 s
<b>annealing</b> 40 x	50 - 60 °C <sup>*)</sup>	1,5 min
<b>elongace</b>	72 °C	2 min
<b>konečná elongace</b>	72 °C	10 min
<b>chlazení</b>	4 °C	$\infty$

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

#### 4.4 Kontrolní elektroforéza v agarózovém gelu

Po PCR se 5  $\mu$ l vzorku smíchalo s nanášecím pufrům a SYBRgreenem. Směs byla nanášena na 1% agarózový gel a elektroforéza probíhala 12 minut v 0,5x TBE pufru při 100 V. K odečtení jednotlivých velikostí fragmentů byl na každý gel nanášen marker (standardní restriční štěp, obsahující fragmenty o známé velikosti) **DNA FastRuler™ Middle Range DNA Ladder** (ThermoScientific, USA) (obr. 14). Po ukončení elektroforézy byl gel vyfocen na UV transilluminatoru.



**Obrázek 14: Marker.** DNA FastRuler™ Middle Range DNA Ladder. (ThermoScientific, USA). Zdroj: <http://www.thermoscientificbio.com/> [on-line 2014-03-15]

#### 4.5 Purifikace PCR fragmentů a sekvenování

PCR produkty vhodné pro další práci byly přečištěny kitem **GenElute™ PCR Clean-Up** (Sigma-Aldrich, USA) podle návodu výrobce. Purifikovaná DNA byla elektroforeticky ověřována (viz kap. 4.4).

K ověření správnosti detekce byly přečištěné produkty sekvenovány. Sekvenování bylo prováděno sekvenačním servisem Biologického centra AV ČR, v. v. i. na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) pomocí kitu **Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems, USA) podle návodu výrobce. Reakční směs byla namíchána podle schématu v tab. 6.

**Tabulka 6: Reakční směs pro sekvenování přečištěných vzorků po PCR.** (Množství uvedeno pro jednu reakci.)

	množství [ $\mu$ l]
<b>vzorek</b>	3,0
<b>primer</b>	0,5
<b>voda</b>	4,0
	7,5



## Analýza sekvencí

Sekvence byly získány ve formátu \*.ab1. a zpracovávány v programu FinchTV. Upravené sekvence byly převedeny do FASTA formátu (textový soubor „\*.txt“, ve kterém se nacházejí sekvence, tak aby každá z položek, začínala na samostatném řádku znakem „>“).

Pro tvorbu tzv. alignmentů (seřazení homologních bází pod sebe) byl použit program ClustalW přes rozhraní programu BioEdit.

Získané sekvence byly porovnávány s nukleotidovou databází NCBI (National Center for Biotechnology Information) na stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pomocí služby BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### 4.6 Hybridizace

V této práci byl použit mikročip **Greiner Bio One** (USA) s 12 poli pro 12 individuálních hybridizačních reakcí. Na mikročipu jsou próby (autor Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.) pro detekci jednotlivých skupin fytoplazem, a pro některé druhy virů (rozmístění uvedeno v tabulce 14 v přílohách). Próby byly na mikročip natištěny firmou Lambda (Freistadt, Rakousko).

Přečištěné hybridizující sekvence byly smíchány s hybridizačním pufrem (500 µl formamidu, 500 µl 20x SSC, 20 µl 10% SDS) v poměru 1:1 (15 µl vzorku a 15 µl pufru), denaturovány při 93 °C 3 minuty a zchlazeny na 4 °C. Na jedno pole mikročipu bylo nanášeno 30 µl připravené směsi. Hybridizace probíhala při 42 °C nejprve 60 minut, později přes noc (tj. 16 hodin). Následně byl mikročip promýván pufrů o teplotě 42 °C podle následujícího schématu:

Promývací pufrů		
I.	2x SSC + 0,1% SDS	1 min.
II.	1x SSC	1 min.
III.	0,1 x SSC	5 min.

Po promytí byl mikročip usušen dnem vzhůru a následně skenován na skeneru Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, UK) programem Typhoon Scanner Control v. 4.0. Celý proces probíhal za minimálního přístupu světla.

## 5. Výsledky

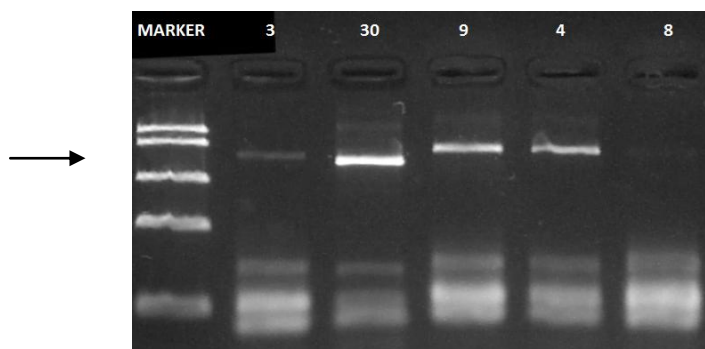
### 5.1 Příprava hybridizujících sekvencí

Prvním z hlavních cílů práce bylo získat a fluorescenčně označit fragmenty DNA (příp. cDNA) fytoplazem vhodné k hybridizaci na mikročip. Nejprve bylo potřeba optimalizovat podmínky PCR, k čemuž byly použity sbírkové izoláty prof. Bertaccini (Itálie). Poté byla metoda optimalizována pro přírodní vzorky – izoláty z hmyzu od prof. Navrátila (ČR) a vzorky rostlin sesbírané v okolí Českých Budějovic.

#### Sbírkové rostliny

„Sbírkové rostliny“ zahrnují vzorky fytoplazem izolované z různých rostlin z celého světa. Tyto izoláty byly přeneseny a uchovávány (množeny) v barvínku růžovém (*Catharanthus roseus*). K dispozici jsem měla charakterizované izoláty DNA prof. Bertaccini, které sloužily jako výchozí materiál k optimalizaci detekční metody. Testováno bylo 15 primerů (11 „forward“ a 4 „reverse“) v různých kombinacích. Použity byly pro 445 reakcí, z nichž 245 vyšlo pozitivně a 200 vyšlo negativně. Do pozitivních výsledků jsou zahrnuty reakce s produkty jakékoliv délky (specifické i nespecifické). Nejprve byly testovány náhodně zvolené dvojice primerů. Primery F6 + R4 při 60 °C s 1 μl Mg<sup>2+</sup> se podařilo amplifikovat 5 skupin fytoplazem, konkrétně II-A, II-C, V-A, V-E, X-C, XI, XII a XII-A. Primery F7 + R4 při 60 °C s 1 μl Mg<sup>2+</sup> se podařilo amplifikovat skupiny I-F, V-E, VII-A, X-C a XI. Oba páry primerů jsou specifické pouze pro některé skupiny fytoplazem, proto je amplifikují snadněji než ostatní. Ve snaze amplifikovat pomocí jednoho páru primerů všechny dostupné skupiny fytoplazem, byly testovány reakce i při teplotách pod 50 °C (viz obr. 34 a 35 v přílohách). Ani v tomto případě se nepodařilo najít vhodné podmínky pro amplifikaci všech skupin a ani výsledky z mikročipů nebyly ideální, proto byla tato verze zamítnuta. V další fázi testování byly zkoušeny kombinace třech a více primerů v jedné reakci. Zde nejlepší výsledky vykazovaly primery F8as + F8bs + R4 při 50 °C s 1 μl Mg<sup>2+</sup>, kterými se podařilo úspěšně amplifikovat 5 skupin fytoplazem, konkrétně I-C, I-F, II-A, II-C, III-A, V-E a XII. Nejvíce skupin se podařilo amplifikovat kombinací primerů F8 + R4 při 55 °C s 1 μl Mg<sup>2+</sup> (obr. 15), konkrétně I-A, I-B, I-C, I-F, III-A, III-H, V-E, VI, IX, X-B, X-C, XI. Skupinu II lze amplifikovat za stejných podmínek, pouze s přidavkem 1,25 μl primeru F8b. Skupiny V-A a XII lze nejlépe amplifikovat primery F6 + R4 při 60 °C s 1 μl Mg<sup>2+</sup>. Skupinu VII je podařilo amplifikovat pouze primery F7 + R4

při 60 °C s 1 µl Mg<sup>2+</sup>. Výsledné optimalizace pro jednotlivé skupiny jsou shrnuty v tabulce 7.



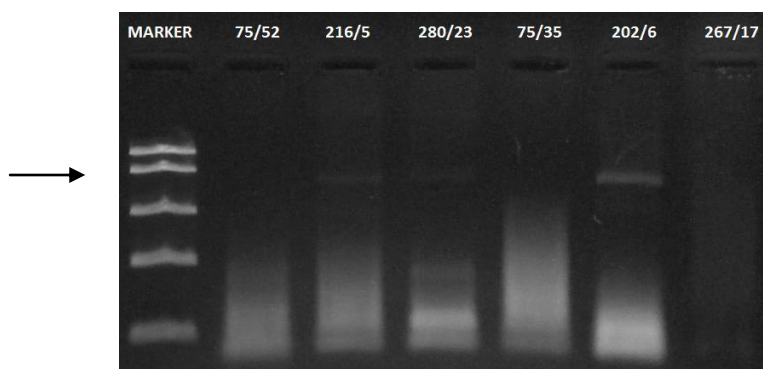
**Obrázek 15: Příklad amplifikace úseku rpS3 genu fytoplazmové DNA ze sbírkových izolátů.** Vzorky 3 (sk. VI), 30 (sk. I-C), 9 (sk. III), 4 (sk. IX) a 8 (X-C). Reakce s primery F8a (Cy3) + R4 (Cy5) při teplotě annealingu 55 °C, (+1 µl Mg<sup>2+</sup>). Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou. Primer F8a (Cy3) se sekvenčně shoduje s primerem F8 (viz tab. 3).

**Tabulka 7: Optimalizované kombinace primerů pro detekci jednotlivých skupin fytoplazem.** Odchytky od optimalizované metody jsou vyznačeny červeně.

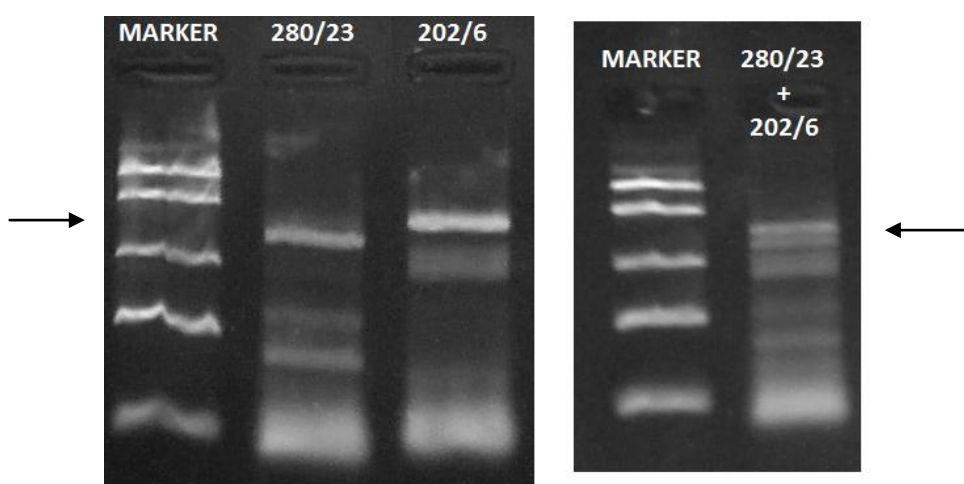
skupina 16Sr	podskupina	kombinace primerů	podmínky
I.	A	F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
	B		
	C		
	F		
II.	A	F8+F8b+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
	C		
III.	A	F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
	H		
V.	A	F6+R4	60 °C, Mg <sup>2+</sup>
	E	F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
VI.		F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
VII.	A	F7+R4	60 °C, Mg <sup>2+</sup>
IX.		F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
X.	B	F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
	C		
XI.		F8+R4	55 °C, Mg <sup>2+</sup>
XII.	-	F6+R4	60 °C, Mg <sup>2+</sup>
	A		

## Izoláty DNA hmyzu

K dispozici jsem měla vzorky vyizolované DNA tří skupin fytoplazem, konkrétně skupiny I., X., a XII. Do reakce byly nejprve použity primery optimalizované pro sbírkové vzorky: F8+R4 při 55 °C s 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$  (viz obr. 16). Po nepříliš úspěšné amplifikaci byly hledány jiné vhodnější kombinace primerů a k nim optimální podmínky (viz přílohy, obr. 32 a 33). Protože nebylo možné najít klasický pár, který by amplifikoval všechny tři skupiny fytoplazem, zvolila jsem kombinaci více primerů. Nejlepší výsledky vykazovaly primery v kombinaci F8as+F8bs+R4 při teplotě annealingu 50 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Takto se podařilo amplifikovat skupiny I a XII. Tyto skupiny byly testovány samostatně i v uměle vytvořených směsích (obr. 17). Izoláty obsahující skupinu X se nepodařilo amplifikovat žádnými z testovaných kombinací primerů.



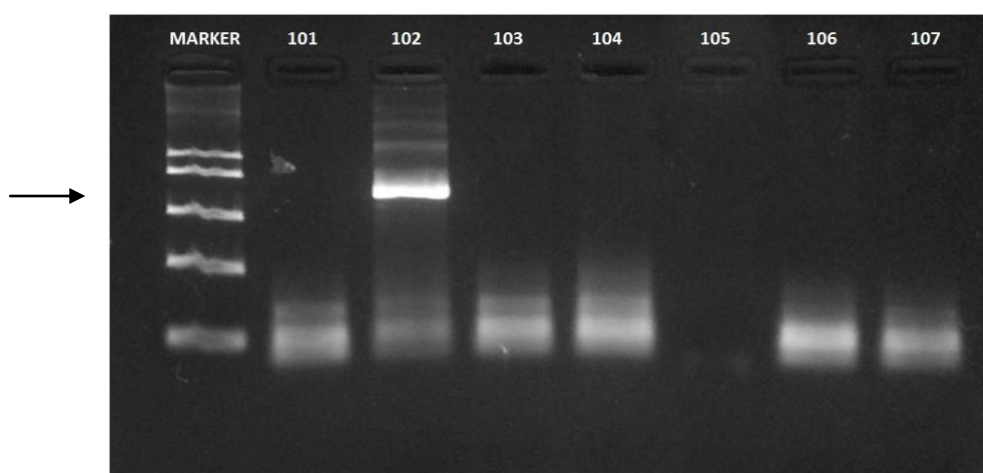
**Obrázek 16:** Příklad amplifikace úseku *rpS3* genu z fytoplazmové DNA izolátů hmyzu. Vzorky 75/52 (sk. X), 216/5 (sk. XII), 280/23 (sk. I), 75/35 (X), 202/6 (sk. XII), 267/17 (sk. I) s primery F8 + R4 (Cy5) při 55 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



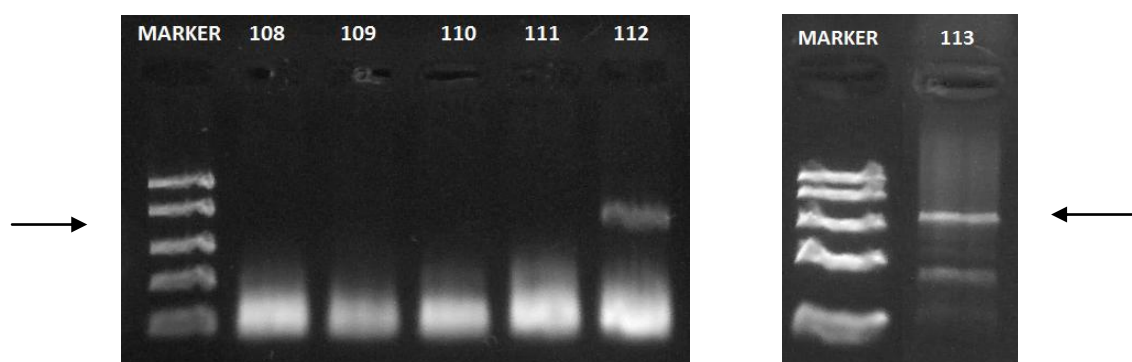
**Obrázek 17:** Příklad amplifikace úseku *rpS3* genu z fytoplazmové DNA izolátů hmyzu. Vzorky 280/23 (sk. I), 202/6 (sk. XII) a uměle vytvořená infekce ze vzorků 280/23 (sk. I) a 202/6 (sk. XII) s primery F8as + F8bs + R4 (Cy5) při 55 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.

## Přírodní vzorky

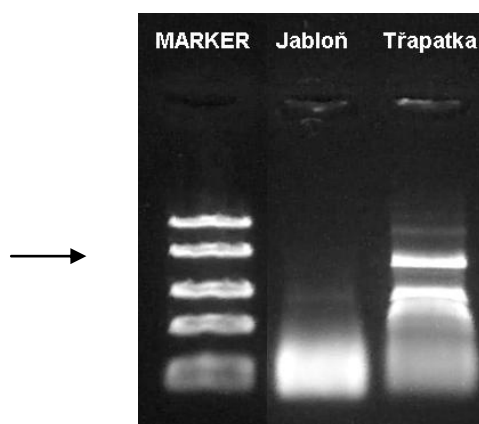
Vzorky rostlin byly sesbírané v okolí Českých Budějovic na základě specifických i nespecifických příznaků (viz kap. 2.1 a obr. 2c). Vyizolovaná DNA (viz tab. 13) byla použita pro amplifikaci fragmentů optimalizovanými primery. Úspěšně se podařilo amplifikovat fytoplazmu v řepce olejce (*Brassica napus*) (obr. 18), jeteli lučním (*Trifolium pratense*), miříku celeru (*Apium graveolens*) (obr. 19) a třapatce nachové (*Echinacea purpurea*) (obr. 20). Poté byly vzorky sekvenovány a hybridizovány na mikročip. Na základě výsledků (viz dále) byly určeny jejich skupiny.



**Obrázek 18: Amplifikace úseku rpS3 genu fytoplazmové DNA z přírodních vzorků.** Vzorky jasan, řepka, svlačec, ořešák, šeřík, rajče a bez černý s primery F8+R4 (Cy5) při teplotě annealingu 55 °C s přidávkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



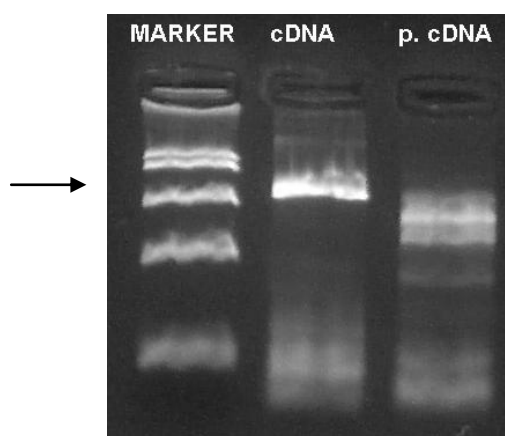
**Obrázek 19: Amplifikace úseku rpS3 genu fytoplazmové DNA z přírodních vzorků.** Vzorky vlevo: hrušeň, bolševník, jetel plazivý, smetánka lékařská, jetel luční; vpravo: celer s primery F8+R4 (Cy3) při teplotě annealingu 55 °C s přidávkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



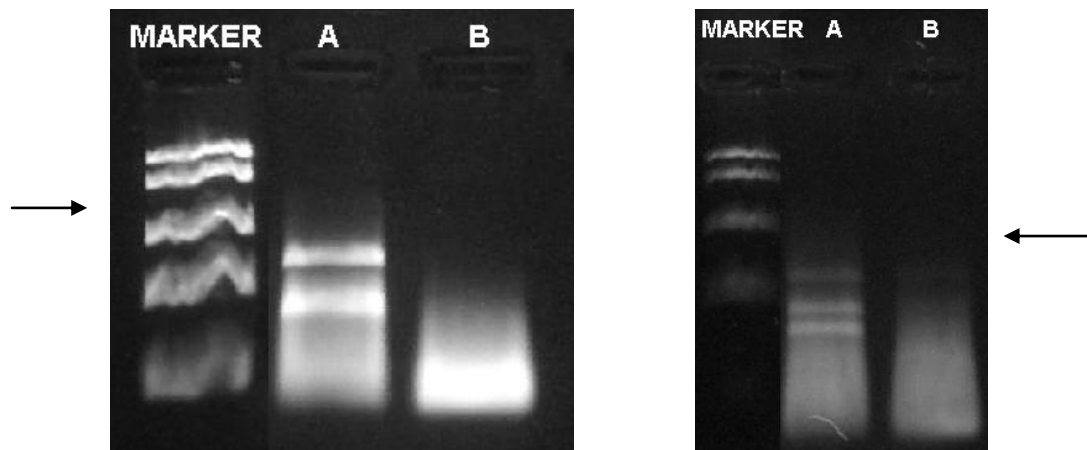
**Obrázek 20: Amplifikace úseku rpS3 genu fytoplazmové DNA z přírodních vzorků.** Vzorky jabloně domácí a třapatky nachové s primery F8 + R4\_1 (Cy5), při teplotě annealingu 55 °C, (+1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ ). Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.

## 5.2 Detekce fytoplazem z celkové RNA

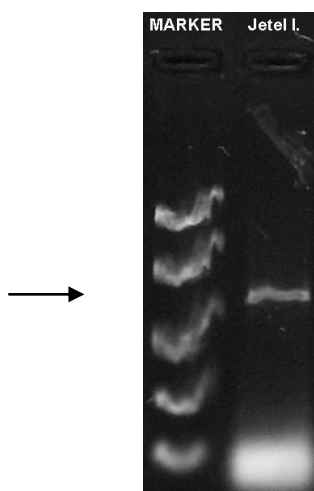
U vybraných přírodních vzorků rostlin byla izolována celková RNA. Výhodou detekce fytoplazem z RNA může být vysoké množství kopií mRNA přítomné v živé buňce, tedy i zvýšené množství výchozího templátu pro amplifikaci. Izolace byla provedena u vzorků řepky, svlačce, jetele lučního, celeru, jabloně a třapatky. RNA byla přepsána náhodnými primery do cDNA a následovala amplifikace optimalizovanými primery. Vzorky řepky olejky (obr. 21), jetele lučního (obr. 23), jabloně domácí a třapatky nachové (obr. 22) vykazovaly pozitivní reakce. U svlačce a celeru se přítomnost fytoplazmy prokázat nepodařilo. V porovnání s amplifikací stejných vzorků testovaných z izolátů DNA se výrazně lepších výsledků dosáhnout nepodařilo.



**Obrázek 21: Amplifikace cDNA ze vzorku řepky olejky.** Reakce s primery F8 + R4 (Cy5), při teplotě annealingu 55 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . **cDNA:** přímo 0,5  $\mu\text{l}$  vzorku cDNA; **p. cDNA:** před amplifikací byla cDNA přečištěna a do reakce bylo použito 6,5  $\mu\text{l}$  přečištěné cDNA. Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



**Obrázek 22: Amplifikace cDNA z přírodních vzorků.** Vlevo jablůň domácí, vpravo třapatka nachová. Reakce s primery F8 + R4\_1 (Cy5), při teplotě annealingu 55 °C. (A) bez přídavku  $Mg^{2+}$ , (B) s  $1\mu l Mg^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



**Obrázek 23: Amplifikace cDNA ze vzorku jetele lučního.** Reakce s primery F8as + F8bs + R4 (Cy3) při teplotě annealingu 50 °C s  $1\mu l Mg^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.

### 5.3 Sekvenování a analýza sekvencí

Sekvenování sloužilo k ověření amplifikovaných fragmentů. Sekvenovány byly sbírkové izoláty prof. Bertaccini, izoláty DNA z hmyzu prof. Navrátila a pozitivní reakce přírodních vzorků rostlin z izolátů DNA i RNA (viz výše). Čitelné sekvence se podařilo získat od zástupců všech 16Sr skupin sbírkových izolátů (viz tab. 8). Některé sekvence byly uloženy do nukleotidové databáze NCBI (identifikační čísla sekvencí v tab. 8). U vzorku jetele lučního a řepky olejky můžeme podle sekvence porovnané s databází (NCBI – BLAST) určit skupinu fytoplazmy. Obě sekvence se shodují s databázovými vzorky skupiny I – „*Aster yellows*“ (viz přílohy, kap. 9.4 – sekvence 1 a sekvence 2). Získané sekvence byly použity spolu se sekvencemi z databáze k návrhu nových prób.

**Tabulka 8: Přehled provedených sekvenčních reakcí s pozitivním výsledkem.** Uvedeny jsou použité primery (pro jednu sekvenční reakci vždy jeden primer) a výsledek z BLASTu + identifikační číslo sekvence uložené v nukleotidové databázi na stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

vzorek	skupina 16Sr	sekvenační primer	výsledek BLAST	identifikační číslo (NCBI)
30	I-C	F8, R4	I	JQ900568.1
36	I-B	F8, R4	I	JQ900567.1
25	I-A	F8, R4	I	JQ900566.1
31	I-F	F8, R4	I	JQ900569.1
16	II-A	F8, R4	II	JQ900570.1
32	III-A	F8, R4	III	JQ900571.1
35	V-A	R4, F8, R1, F2	V	JQ900573.1
22	V-E	F8, R4	V	JQ900574.1
3	VI	F8, R4	VI	JQ900575.1
37	VII-A	F7, R4	VII	-
6	VII-A	F8, R4, F7	VII	JQ900576.1
4	IX	F8, R4	IX	JQ900577.1
8	X-C	F8, R4	X	JQ900579.1
28	X-B	F8, R4	X	JQ900578.1
11	XI	F7, R4	<b>I</b>	-
13	XII	F8, R4	<b>III</b>	JQ900580.1
Jetel	neurčeno	R4	I	-
řepka	neurčeno	F8	I	-

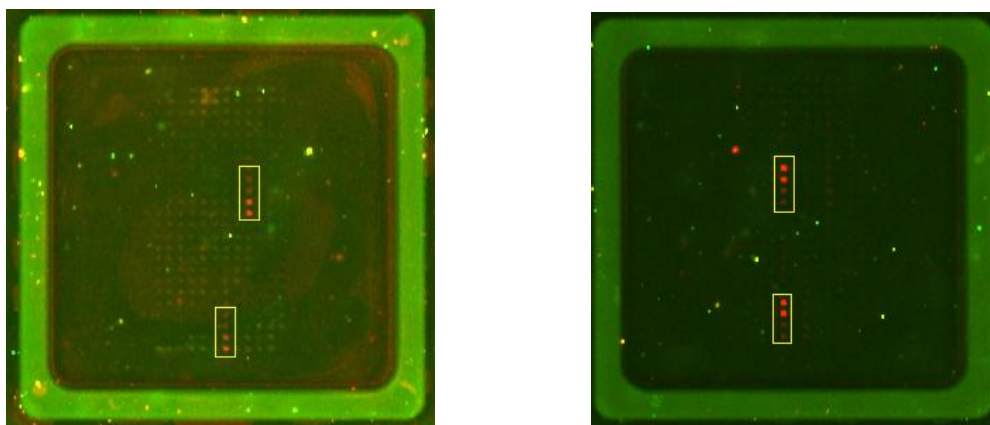


## 5.4 Hybridizace

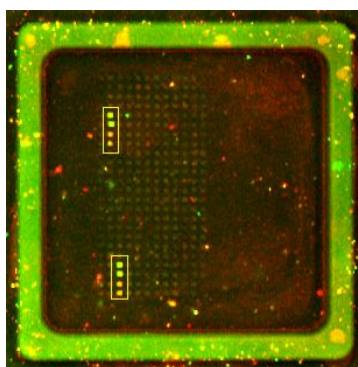
Hlavním cílem práce bylo detekovat fytoplazmy pomocí hybridizace na DNA mikročipu. Postup hybridizace je popsán v kapitole 4.6. Po skenování byla data zpracována pomocí programu ImageQuant TL v 2003.02. Celkem bylo provedeno 110 hybridizací. Testovány byly i uměle vytvořené směsné infekce. Umělé směsné infekce byly míchány, tak že do PCR reakce bylo dáno od každého vzorku vybraných izolátů 0,5  $\mu$ l DNA.

### Sbírkové izoláty

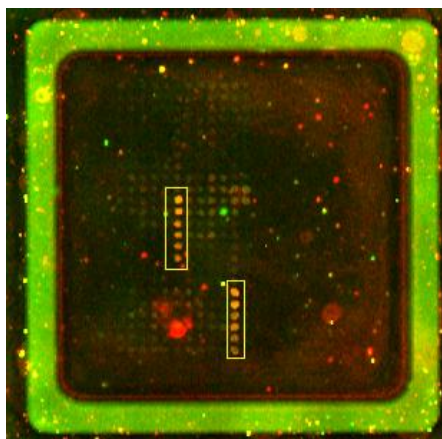
Detekovat fytoplazmu pomocí hybridizace ze sbírkových izolátů se podařilo u všech dostupných skupin 16Sr -I (obr. 27), -II (obr. 25), -III (obr. 28), -V (obr. 24), -VI (obr. 26), -VII (obr. 36), -IX, -X (obr. 24), -XI, -XII (obr. 36).



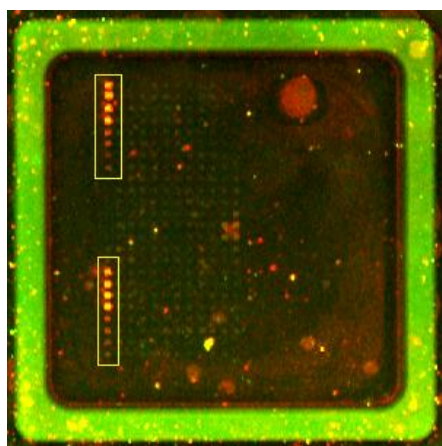
**Obrázek 24: Hybridizace.** Vlevo příklad hybridizace vzorku 8 (sk. X-C) s primery F8 + R4 (Cy5) a vpravo vzorku 35 (sk. V-A) s primery F6 + R4 (Cy5).



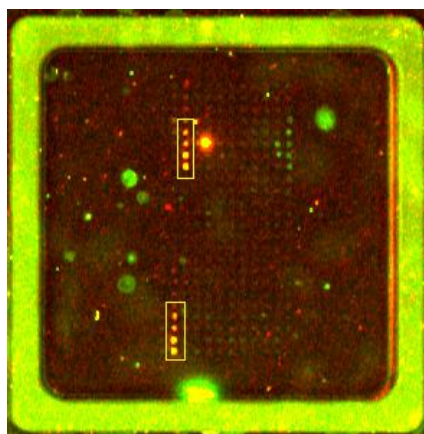
**Obrázek 25: Hybridizace – duální značení.** Příklad hybridizace vzorku 26 (sk. II-A). PCR reakce byla připravena s primery F8a (Cy3) + F8b (Cy3) + R4 (Cy5).



**Obrázek 26: Hybridizace – duální značení.** Příklad hybridizace vzorku 3 (sk. VI). PCR reakce byla připravena s primery F8a (Cy3) + R4 (Cy5).



**Obrázek 27: Hybridizace – duální značení.** Příklad hybridizace vzorku 30 (sk. I-C). PCR reakce byla připravena s primery F8a (Cy3) + R4 (Cy5).



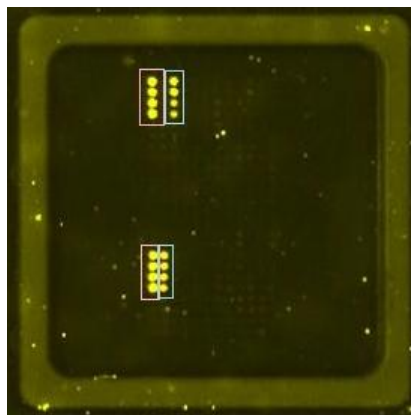
**Obrázek 28: Hybridizace – duální značení.** Příklad hybridizace vzorku 9 (sk. III-A). PCR reakce byla připravena s primery F8a (Cy3) + R4 (Cy5).

## Směsné infekce

Testovány byly vybrané uměle vytvořené směsné infekce (viz tab. 9). Společně se spolehlivě podařilo detekovat skupinu 16Sr-I se skupinou 16Sr-III (obr. 29) nebo 16Sr-V, a skupinu 16Sr-III se skupinou 16Sr-V. U ostatních testovaných kombinací hybridizovala pouze jedna skupina nebo žádná. Vzhledem k absenci „bandu“ o specifické délce na elektroforetickém gelu mohl být tento výsledek způsoben také obtížemi při amplifikaci dvou skupin v PCR.

**Tabulka 9: Směsné infekce.** Kombinace skupin (16Sr) použitých k míchání směsných infekcí. Červeně odlišeny skupiny hmyzu. V posledním sloupci vyznačen pozitivní (✓) a negativní (-) výsledek hybridizace na mikročipu u jednotlivých reakcí.

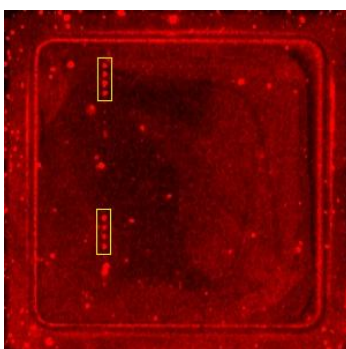
I	III	✓
	V	✓
III	II	-
	X	-
	XII	-
	VI	-
	V	✓
I	XII	-



**Obrázek 29: Hybridizace – směsné infekce.** Příklad hybridizace uměle vytvořené směsné infekce se vzorky ze sbírkových izolátů 30 (I-C) a 15 (III-A). Reakce byla připravena primery F8 + R4 (Cy3).

### Přírodní vzorky

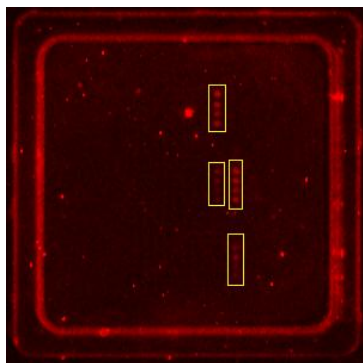
Na mikročipu byly testovány pozitivní reakce PCR z přírodních vzorků DNA (řepka olejka, jetel luční a třapatka nachová) i RNA (řepka olejka, jetel luční, třapatka nachová a jablň domáci). Úspěšně se podařilo hybridizovat vzorky řepky olejky (obr. 30) a jetele lučního z DNA, třapatky nachové z DNA i z RNA a jablň domáci z RNA. Vzorky řepky olejky, jetele lučního a jablň domáci hybridizovaly k prábám ze skupiny I. Vzorek třapatky nachové hybridizoval k prábám ze skupiny I a III. Zda jde skutečně o smšnou infekci, bude předmětem dalšího zkoumání. Na základě těchto výsledků nelze přesně určit, zda je lepší detekovat fytoplazmy z DNA nebo z RNA. Pro detailnější srovnání by bylo potřeba testovat více vzorků.



**Obrázek 30: Hybridizace řepky olejky.** Hybridizující sekvence byla připravena primery F8 + R4 (Cy5).

### Izoláty DNA hmyzu

Všechny získané hybridizující sekvence byly testovány na mikročipu. Pozitivní výsledek se podařilo získat pouze u jediného vzorku s označením 202/6 ze skupiny XII (obr. 31).



**Obrázek 31: Hybridizace.** Příklad hybridizace vzorku 202/6 (izolát z hmyzu). Hybridizující sekvence byla připravena primery F8as + F8bs + R4 (Cy5).

#### 5.4.1 Vyhodnocení a návrh prób

Jednotlivé próby byly porovnávány se získanými sekvencemi (viz kap. 5.3, tab. 8). Na základě porovnání pro ně byly vypočítány procenta podobnosti k sekvencím z daných skupin fytoplazem. Podobnost mezi sekvencemi by neměla klesnout pod 85 %. Próby Ia, Ib, IId2, IIIa2, IIIb, Va, Vb, VIa2, VIb2, VIc, VIId, VIIb, VIIc, Xf, Xg, XIIa a XIIb jsou 100% komplementární k získaným sekvencím z daných skupin. Próba Xe je komplementární z 95 %, próba IIc z 51 %, VIIa z 50 %, IXa z 87,5 %, IXb z 95 %, IXc z 98 %, XIIc z 97 % a XIId z 97 %. Cílem návrhu nových prób je zlepšit rozlišení jednotlivých skupin fytoplazem. V tabulce 10 navrhuji řešení nových prób tak, aby byly podobné co největšímu počtu získaných i databázových sekvencí dané skupiny a zároveň odlišné od skupin ostatních.

**Tabulka 10: Návrh nových prób.** V tabulce jsou uvedeny skupiny fytoplazem, pro které jsou próby navrženy, sekvence próby, identifikační číslo sekvence v databázi, podle které byla próba navržena a pozice próby v databázové sekvenci

16Sr	sekvence (5' → 3')	pozice	identifikační číslo (NCBI)
<b>II</b>	GGTATGCAGAAGATAAAAAAGTTCCTTTGTTAATTAATGA	354 – 393	JQ900570
<b>VII</b>	TATATACTTGCAAAATAGGTCTTGTTCAAGGTCAAGAAAAT	474 – 514	JQ900576
<b>IX</b>	TTACTATTAATTTATTTACTTCTAAAATTGGATTAATACAAGGTAT	579 – 622	JQ900577
<b>XII</b>	TATTGCTGAACAATTAGAAAACCGAATGAAATTTTCGTCGTG	512 – 552	JQ900580

## 6. Diskuze

Ze všech zmíněných možností detekce fytoplazem (mikroskopické, sérologické, molekulární) jsou nejvhodnějším a nejčastěji používaným nástrojem molekulární metody založené na amplifikaci a hybridizaci nukleových kyselin. Zmíněná diagnostika může být snadno použitelná k obecné detekci (zda se fytoplazma ve vzorku nachází) či ke specifické identifikaci (zařazení fytoplazmy do konkrétní 16Sr skupiny nebo druhu „Candidatus“). Dosud nepoužívanějšími molekulárními metodami detekce fytoplazem jsou různé modifikace PCR a následná RFLP analýza. Margaria a Palmano (2013), Christensen et al. (2012) a mnoho dalších využívá ve svých metodikách pro detekci fytoplazem real-time PCR. Ale ve všech těchto případech lze jedním testem ve vzorku detekovat pouze jednoho patogena (Hadidi *et al.*, 2004). Do dnešní doby byly navrženy dvě metodiky k detekci fytoplazem pomocí DNA mikročipů, kterými lze detekovat přítomnost více skupin současně. Nicolaisen a Bertaccini (2007) využívají ve své práci 16S rRNA a Lenz *et al.* (2011) 16S – 23S spacer. Tyto oblasti mají ale malou variabilitu mezi jednotlivými skupinami fytoplazem. Navíc se nacházejí v genomu ve dvou kopiích, které nemusí být stejné. To může vést k falešně pozitivním výsledkům, kdy jedna fytoplazma (se dvěma různými kopiemi rRNA) je určena jako smíšená infekce dvou fytoplazem. Z toho důvodu je výhodnější použít jiné variabilnější geny, které se v genomu vyskytují pouze jednou. Takovými mohou být právě geny pro ribozomální proteiny rps3, rpl22 a rp19 testované v této práci.

Izolaci nukleových kyselin jsem prováděla komerčními soupravami určenými k izolaci celkové DNA/RNA z rostlinných tkání. Ty většinou obsahují méně než 1 % fytoplazmové DNA/RNA (Bertaccini a Duduk, 2009). Důležitou fází molekulární detekce je proto izolace kvalitní nukleové kyseliny. Limitním faktorem detekčních metod není v řadě případů citlivost testu, ale skutečnost, že spoléhají na relativně čisté templáty DNA. Získat takový templát je časově i finančně značně náročné. Rozmístění fytoplazem v rostlinách je variabilní, proto se nemusí vždy podařit z odebraného vzorku získat reprezentativní vzorek. Izolát DNA může obsahovat i mnoho inhibičních látek, které se nemusí vždy povést odstranit. Mě se podařilo ze 17 vzorků vyizolovat a následně detekovat fytoplazmu ve čtyřech z nich. K přesnějšímu určení přítomnosti fytoplazmy by se mohlo odebrat více vzorků z různých částí rostlin. Ke snazší, přesnější a rychlejší izolaci vzorků pro takový screening by se mohla použít izolace uvedená v metodice Mehle *et al.* (2013), kde

autoři popisují účinnou extrakci DNA vhodnou pro amplifikaci DNA fragmentů. Ta kombinuje jednoduchou a rychlou homogenizaci surových extraktů floému s extrakcí DNA pomocí magnetických kuliček. DNA se čistí v automatizovaném procesu, kde magnetické kuličky procházejí řadou promývacích pufrů.

V této práci jsem se snažila porovnat detekci fytoplazem z izolátů DNA s izoláty RNA. Obsah mRNA se v organismu mění v závislosti na fyziologii nebo vývoji jedince. Volba amplikonu tedy musí být zaměřena na podstatu exprimovaného genu nebo ribozomální proteiny. Výhodou detekce fytoplazem z RNA může být právě vysoké množství kopií fytoplazmové mRNA přítomné ve fytoplazmě (a tím i v rostlině), což má za následek zvýšené množství výchozího templátu pro amplifikaci. (Margaria a Palmano, 2013). Získáme tedy ze stejné části vzorku vyšší koncentraci templátu. Právě proto byla detekce fytoplazem z izolované celkové RNA v této práci zkoušena. V porovnání s výsledky hybridizace z DNA se však lepších výsledků dosáhnout nepodařilo, výsledky byly srovnatelné. To může být způsobeno vysokou koncentrací rostlinné RNA, která by mohla být přednostně přepisována do cDNA. Další možností může být přítomnost inhibitorů, které mohou bránit v přepisu RNA. V neposlední řadě musíme brát v úvahu i fakt nerovnoměrné aktivity fytoplazem v čase. To znamená, že pokud se fytoplazma zrovna nemnoží a nepotřebuje tyto geny, mRNA (tedy templát pro PCR) se netvoří. Nicméně pro detailnější srovnání a stanovení příčiny výsledků experimentu by bylo potřeba testovat více vzorků.

Dalším předmětem zkoumání byla detekce fytoplazem v izolátech DNA z hmyzu. Zde se podařilo hybridizací detekovat pouze fytoplazmu ze skupiny 16Sr-XII. Důvodem neúspěchu může být samotná izolace DNA, degradace DNA při transportu izolátů nebo již zmíněná přítomnost inhibičních látek z hmyzu, které mohou blokovat PCR. V dalším postupu se bude potřeba zaměřit na izolaci DNA a optimalizaci PCR, tak aby bylo možno detekovat i další skupiny fytoplazem z hmyzích vektorů, popřípadě rozlišit jejich směsné infekce.

V boji proti šíření fytoplazmových nákaz je důležité tyto patogeny rychle detekovat. Vyvinutá PCR v tomto případě umožňuje spolehlivě amplifikovat maximálně dvě fytoplazmy v jedné reakci. Ty jsou následně rozlišeny na mikročipu. S rostoucím výskytem směsných infekcí je takové metody stále více potřeba. Alma et al. (1996) v Severní Itálii potvrdili směsnou infekci fytoplazmových skupin 16Sr-I a 16Sr-V v révě vinné (*Vitis vinifera* L.). Stejně skupiny byly detekovány např.

v čínské datli (*Zizyphus jujuba*) v roce 2009 v Koreji a v roce 2013 v Číně (Lee et al., 2009; Sun et al., 2013). Mě se podařilo předběžnými testy s uměle vytvořenými směsnými infekcemi současně detekovat skupinu 16Sr-I se skupinou 16Sr-III nebo 16Sr-V a skupinu 16Sr-III se skupinou 16Sr-V. Z toho vyplývá, že je možné tento přístup použít, ovšem pro jeho praktické využití bude potřeba metodu dále testovat, případně přidat další primery do PCR, tak aby bylo možno amplifikovat více fytoplazem v jedné reakci od co možná nejvíce skupin.



## 7. Závěr

Hlavním cílem diplomové práce bylo detekovat fytoplazmy pomocí DNA-mikročipu.

Nejprve se z čerstvých vzorků komerčními kity izolovala rostlinná DNA, případně RNA. RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA. K získání dostatečného množství značené hybridizující sekvence byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). K optimalizaci PCR sloužily sbírkové izoláty prof. Bertaccini (Itálie). Poté byla metoda vyzkoušena na přírodní vzorky – izoláty z hmyzu od prof. Navrátila (ČR) a vzorky rostlin sesbírané v okolí Českých Budějovic.

V následujícím kroku byly amplifikované produkty sekvenovány. Čitelné sekvence se podařilo získat od zástupců všech 16Sr skupin sbírkových izolátů. Některé sekvence byly uloženy do nukleotidové databáze NCBI pod následujícími přístupovými čísly: JQ900566.1, JQ900567.1, JQ900568.1, JQ900569.1, JQ900570.1, JQ900571.1, JQ900573.1, JQ900574.1, JQ900575.1, JQ900576.1, JQ900577.1, JQ900578.1, JQ900579.1, JQ900580.1. U vzorku jetele lučního a řepky olejky můžeme podle sekvence porovnané s databází (NCBI – BLAST) určit skupinu fytoplazmy. Obě sekvence se shodují s databázovými vzorky skupiny I – „*Aster yellows*“.

Připravené fragmenty byly hybridizovány na mikročip. Detekovat fytoplazmu pomocí hybridizace ze sbírkových izolátů se podařilo u všech dostupných skupin 16Sr -I, -II, -III, -V, -VI, -VII, -IX, -X, -XI, -XII. V DNA z hmyzích vektorů to bylo pouze u jediného vzorku s označením 202/6 ze skupiny 16Sr-XII. U přírodních vzorků se podařilo detekovat fytoplazmu ve vzorcích řepky olejky, jetele lučního, třapatky nachové a jabloně domácí.

V práci byla porovnáována detekce fytoplazem z DNA s detekcí fytoplazem z RNA. U porovnaných hybridizací se lepších výsledků dosáhnout nepodařilo, výsledky byly srovnatelné.

Metoda byla testována i na detekci více fytoplazem v jedné reakci. To se podařilo u skupin 16Sr -I s -III, 16Sr-I s -V a 16Sr -III s -V, pro praktické využití detekce všech skupin fytoplazem bude potřeba další optimalizace postupu.

Dosažené výsledky jsou součástí rukopisu „Discrimination of phytoplasmas using an oligonucleotide microarray targeting rps3, rpl22, and rps19 genes” (O.Lenz, J. Marková, T. Sarkisová, J. Fránová, J. Příbylová) odeslaného k recenzi do časopisu „Crop Protection“ (IF = 1.402).

## 8. Seznam použité literatury

**Alma, A.; Davis, R. E.; Vibio, M.; Danielli, A.; Bosco, D.; Arzone, A.; Bertaccini, A.** Mixed Infection of Grapevines in Northern Italy by Phytoplasmas Including 16S rRNA RFLP Subgroup 16SrI-B Strains Previously Unreported in This Host. *Plant Disease*. 1996, vol. 80, issue. 4, s. 418–421.

**Andersen, M. T.; Liefting, L. W.; Havukkala, I.; Beever, R. E.** Comparison of the Complete Genome Sequence of Two Closely Related Isolates of ‘Candidatus *Phytoplasma australiense*’ Reveals Genome Plasticity. *BMC Genomics*. 2013, Vol. 14, issue 1, s. 529-. DOI: 10.1186/1471-2164-14-529. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/529>

**Bai, X.; Zhang, J.; Ewing, A.; Miller, S. A.; Jancso R. A.; Shevchenko, D. V.; Tsukerman, K.; Walunas, T.; Lapidus, A.; Campbell, J. W.; Hogenhout, S. A.** Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *Journal of Bacteriology*. 2006, Vol. 188, issue 10, s. 3682-3696. DOI: 10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006>

**Bertaccini, A.** Phytoplasmas: Diversity, Taxonomy, and Epidemiology. *Frontiers in Bioscience*. 2007, Vol. 12, issue 1, s. 673-. DOI:10.2741/2092. Dostupné z: <http://www.bioscience.org//2007/v12/af/2092/fulltext.htm>

**Bertaccini, A.; Duduk, B.** Phytoplasma and Phytoplasma Diseases: a Review of Recent Research. *Phytopathologia mediterranea*. 2009, Vol. 48, issue 3, s.355-378.ISSN:0031-9465. Dostupné z: <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/viewFile/3300/2994>

**Firrao, G.; Garcia-Chapa, M.; Mazrachi, C.** Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host. *Frontiers in Bioscience*. 2007, Vol. 12, issue 1, s. 1353-. DOI:10.2741/2153. Dostupné z: <http://www.bioscience.org//2007/v12/af/2153/fulltext.htm>

**Caminade, A.-M.; Padié, C.; Laurent, R.; Maraval, A.; Majoral, J.-P.** Uses of Dendrimers for DNA Microarrays. *Sensors*. 2006, Vol. 6, issue 8, s. 901-914. DOI: 10.3390/s6080901. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/6/8/901/>

**Chang, F.; Chen, C.; Lin, C.** Monoclonal Antibody for the Detection and Identification of a Phytoplasma Associated with Rice Yellow Dwarf. *European Journal of Plant Pathology*. 1995, Vol. 101, issue 5, s. 511-518. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01874475>

**Clark, M. F.; Morton, A; Buss, S. L.** Preparation of Mycoplasma Immunogens from Plants and a Comparison of Polyclonal and Monoclonal Antibodies Made Against Primula Yellows MLO-associated Antigens. *Annals of Applied Biology*. 1989, Vol. 114, issue 1, s. 111-124. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1989.tb06791.x.

**Cheung, V. G.; Morley, M.; Aguilar, F.; Massimi, A.; Kucherlapati, R.; Childs, G.** Making and Reading Microarrays. *Nature Genetics*. 1999, Vol. 21, s. 15-19. DOI: 10.1038/4439. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/4439>

**Christensen, N. M.; Axelsen, K. B.; Nicolaisen, M.; Schulz, A.** Phytoplasmas and Their Interactions with Hosts. *Trends in Plant Science*. 2005, Vol. 10, issue 11, s. 526-535. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.09.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138505002323>

**Christensen, N. M.; Nyskjold, H.; Nicolaisen, M.** Real-Time PCR for Universal Phytoplasma Detection and Quantification. *Methods in Molecular Biology*. 2012, Vol. 938, s. 245-252. DOI: 10.1007/978-1-62703-089-2\_21. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-089-2\\_21](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-089-2_21)

**Čížková, A.** Genové Čipy: Perspektivní Nástroj Biologie i Moderní Medicíny. *Živa*. 2005, Vol. 53 (91), issue 3, s. 98-99. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/2005-3/genove-cipy-perspektivni-nastroj-molekularni-biologie-i-moderni-mediciny.html>

**Demnerová, K.** Mikrobiologická Bezpečnost Potravin: Současné Strategie pro Efektivní Kontrolu. *Chemické listy*. 2012, Vol. 106, issue 10, s. 920-925. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_10\\_920-925.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_920-925.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 Yellows, or Paulownia Witches' Broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan*. 1967, Vol. 33, s. 259-266.

**Garnier, M.; Martin-Gros, G.; Iskra; Zareik; Gandar, J.; Fos, A.; Bove, J. M.** Monoclonal Antibodies Against the MLOs Associated with Tomato Stolbur and Clover Phyllody. *Recent advances in mycoplasmaology*. 1990pp., s. 263-269. Dostupné z: <http://www.imok.ufl.edu/hlb/database/pdf/00000267.pdf>

**Gasparich, G. E.** Spiroplasmas and Phytoplasmas: Microbes Associated with Plant Hosts. *Biologicals*. 2010, Vol. 38, issue 2, s. 193-203. DOI:10.1016/j.biologicals.2009.11.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105609001791>

**Hadidi, A.; Czosnek, H.; Barba, M.** Dna Microarrays and Their Potential Applications for the Detection of Plant Viruses, Viroids, and Phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*. 2004, Vol. 86, issue 2. DOI: 10.4454/jpp.v86i2.944. Dostupné z: <http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/944/730>

**Haggis, G. H.; Sinha, R. C.** Scanning Electron Microscopy of Mycoplasma Like Organisms After Freeze Fracture of Plant Tissues Affected with Clover Phyllody and Aster Yellows. *Phytopathology*. 1978. Vol. 68, issue 4, s. 677-680

**Heller, M. J.** DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2002, Vol. 4, issue 1, s. 129-153. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438>

**Hogenhout, S. A.; Oshima, K.; Ammar, E.; Kakizawa, S.; Kingdom, H. N.; Namba, S.** Phytoplasmas: Bacteria That Manipulate Plants and Insects. *Molecular Plant Pathology*. 2008, Vol. 9, issue 4, s. 403-423. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2008.00472.x.

**Kůdela, V.; Braunová, M.** *Česko-anglická rostlinolékařská terminologie: Czech-English plant health terminology*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007, 874 p. ISBN 80-200-1550-7.

**Lee, C. C.; Mackay, J. A.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C.** Designing Dendrimers for Biological Applications. *Nature Biotechnology*. 2005, Vol. 23, issue 12, s. 1517-1526. DOI:10.1038/nbt1171. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nbt1171>

**Lee, I.; Davis, R. E.; Gundersen-Rindal, D. E.; Kakizawa, S.; Kingdom, H. N.; Namba, S.** Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes 1. *Annual Review of Microbiology*. 2000, Vol. 54, issue 1, s. 221-255. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.221.

Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.54.1.221>

**Lee, S.; Han, S.; Cha, B.** Mixed Infection of 16S rDNA I and V Groups of Phytoplasma in a Single Jujube Tree. *The Plant Pathology Journal*. 2009, Vol. 25, issue 1, s. 21-25. DOI: 10.5423/PPJ.2009.25.1.021. Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1PPBG>

**Lenz, O.; Marková, J.; Sarkisová, T.** Discriminating 16Sr Groups of Phytoplasmas by an Oligonucleotide Microarray Targeting 16S-23S Spacer Region. *Bulletin of Insectology*. 2011. 64 (supplement): S31-S32.

**Lin, C.-P.; An Chen, T.** Monoclonal Antibodies Against the Aster Yellows Agent. *Science*. 1985, Vol. 227, issue 4691, s. 1233-1235. DOI:10.1126/science.227.4691.1233.

Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.227.4691.1233>

**Loi, N.; Ermacora, P.; Carraro, L.; Osler, R.; An Chen, T.** Production of Monoclonal Antibodies against Apple Proliferation Phytoplasma and their Use in Serological Detection. *European Journal of Plant Pathology*. 2002, Vol. 108, issue 1, s. 81-86. DOI: 10.1023/A:1013901706383.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1013901706383>

**Marková, J.** *Detekce fytoplazem pomocí PCR amplifikace vybraných fragmentů fytoplazmového genomu*. České Budějovice, 2011. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

**Margarita, P.; Palmano, S.** Reverse Transcription-PCR for Phytoplasma Detection Utilizing Crude Sap Extractions. *Methods in Molecular Biology*. 2013, Vol. 938, s. 283-289.

**Mehle, N.; Nicolić, P.; Rugar, M.; Boben, J.; Ravnikar, M.; Dermastia, M.** Automated DNA Extraction for Large Numbers of Plant Samples. *Methods in Molecular Biology*. 2013, Vol. 938, s. 139-145.

**Müller, U.; Nicolau, D. V.** *Microarray technology and its applications*. 1st ed. New York, NY: Springer, 2004, p. cm. ISBN 35-402-2931-0.

**Nicolaisen, M.; Bertaccini A.** An Oligonucleotide Microarray-based Assay for Identification of Phytoplasma 16S Ribosomal Groups. *Plant Pathology*. 2007, Vol. 56, issue 2, s. 332-336. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01558.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.2006.01558.x>

**Oshima, K.; Maejima, K.; Namba, S.** Genomic and Evolutionary Aspects of Phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*. 2013, Vol. 4. DOI:10.3389/fmicb.2013.00230. Dostupné z: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2013.00230/full>

Ovlivnění DNA teplem. *Ústav biologie Lékařské fakulty* [online]. - [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Ovlivneni%20DNA%20teplem.htm>

**Pavlík, E.** Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část3. *LaborAktuell*.s.22-25. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>

Použití sond. *Ústav biologie Lékařské fakulty* [online]. - [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Pouziti%20sond.htm>

**Schena, M.** *DNA microarrays: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000, 205 s. ISBN 0-19-963-7768.

**Seddas, A.; Meignoz, R.; Daire, X.; Boudon-Padiou, E.** Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies to Flavescence Dorée Phytoplasma: Serological Relationships and Differences in Electroblot Immunoassay Profiles of Flavescence Dorée and Elm Yellows Phytoplasmas. *European Journal of Plant Pathology*. 1996, Vol. 102, issue 8, s. 757-764. DOI: 10.1007/BF01877150. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01877150>

**Sun, X.-C.; Mou, H.-Q.; Li, T.-T.; Tian, Q.; Zhao, W.-J.** Mixed Infection of Two Groups (16SrI & V) of Phytoplasmas in a Single Jujube Tree in China. *Journal of Phytopathology*. 2013, Vol. 161, issue 9, s. 661-665. DOI: 10.1111/jph.12101. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jph.12101>

**Šťástková, Z.; Karpíšková, R.; Borkovcová, I.** Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2012, Vol. 106, issue 8, s. 745-749. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_08\\_745-749.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_08_745-749.pdf)

**Torres, M. A.** Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens: a novel. *Plant Physiology*. 2006, Vol. 141, issue 2, s. 373-378. DOI:10.1104/pp.106.079467.

Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.079467>

**Vítámvás, P.; Kosová, K.; Škodáček, Z.; Prašil, I.** Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy*, 2010, Vol. 104, issue. 7, s. 671-676. ISSN: 0009-2770. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_07\\_671-676.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_07_671-676.pdf)

**Weintraub, P. G.; Jones, P.** *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Cambridge, MA: CABI North American Office, 2010, 331 p. ISBN 978-184-5935-306.

#### OBRÁZKY:

*Abbott molecular* [online]. 2014 [cit. 2014-03-11]. Dostupné z: <https://www.abbottmolecular.com/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html>

**Bertaccini, A.** Phytoplasmas: Diversity, Taxonomy, and Epidemiology. *Frontiers in Bioscience*. 2007, vol. 12, issue 1, s. 673-. DOI:10.2741/2092.

Dostupné z: <http://www.bioscience.org//2007/v12/af/2092/fulltext.htm>

BIONEER CORPORATION. *Bioneer* [online]. 2011 [cit. 2014-03-11]. Dostupné z: <http://eng.bioneer.com/products/geneexpression/qPCRArrayService-detection.aspx>

*BioExpress: Simply Serving Science* [online]. 2014 [cit. 2014-03-08]. Dostupné z: <http://www.bioexpress.com/divinity-cart/item/154025/GREINER-BIO-ONE-High-Throughput-microArray-HTA-Slides-Plates-and-Scienion-Buffers/1.html>



**Caminade, A.-M.; Padié, C.; Laurent, R.; Maraval, A.; Majoral, J.-P.** Uses of Dendrimers for DNA Microarrays. *Sensors*. 2006, Vol. 6, issue 8, s. 901-914. DOI: 10.3390/s6080901. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/6/8/901/>

DNA. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-03-12]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA\\_Structure%2BKey%2BLabelled.pn\\_No\\_BB.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_No_BB.png)

Fluorescenční barvivo. *Ústav biologie Lékařské fakulty* [online]. - [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescencni%20barvivo.htm>

Our Technology. Genisphere [online]. 2000 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://genisphere.com/our-technology>

**Kodíček, M.** *Reakce polymerasová řetězová. Z Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2014-02-28]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.help.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm)

*Thermo Scientific* [online]. - [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/fastruler-middle-range-dna-ladder-ready-to-use-100-5000-bp/>

**Stekel, D.** *Microarray bioinformatics*. New York: Cambridge University Press, 2003, xiv, 263 p., [8] p. of plates. ISBN 05-215-2587-X.

**Strauss, E.** Phytoplasma Research Begins to Bloom. *Science*. 2009-07-23, Vol. 325, issue 5939, s. 388-390. DOI: 10.1126/science.325\_388. Dostupné z: [http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.325\\_388](http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.325_388)

## 9. Přílohy

## 9.1 Seznam použitých zkratek

angl.	anglicky
AP	apple proliferation phytoplasma (fytoplazma proliferace jabloně)
AY	aster yellows (žloutenka aster)
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
cDNA	DNA komplementární k mRNA
Cy3/Cy5	Cyanin 3 (Cy3) a Cyanin 5 (Cy5)
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenylindol
dNTP's	nukleosid trifosfáty
dsDNA	double-stranded DNA (dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay (enzymová imunosobrční analýza)
FD	flavescence dorée (zlaté žloutnutí révy)
ISEM	imunosorpční elektronová mikroskopie
kap.	kapitola
MLO's	mycoplasma-like organism (mykoplazmám podobné organismy)
mRNA	„messenger“ RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	nukleová kyselina
obr.	obrázek
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PMU	potential mobile units

RFLP	Restriction fragment length polymorfism (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)
ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribonukleová kyselina ribozomální
RYD	Rice yellow dwarf (žlutá zakrslost rýže)
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	skanovací elektronová mikroskopie
SNP	single nukleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
SNR	signal to noise ratio
SSC	solný $\ominus$ citrátu sodného
ssDNA	single-stranded DNA (jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina)
tab.	tabulka
TBE	Tris-borate-EDTA
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Tris	tris-(hydroxymethyl)aminomethan

## 9.2 Roztoky a chemikálie

- **10 x TBE (zásobní ☺)**

108 g Tris + 55 g kyseliny borité + 40 ml 0,5 M EDTA → doplnit na 1 l

- **20 x SSC (zásobní ☺)**

175,3 g NaCl + 88,2 g citrát sodný → rozpustit v 800 ml vody → upravit pH na 7 (HCl) → doplnit na 1 l.

- **10% SDS (zásobní ☺)**

10 g SDS (dodecylsírán sodný) rozpustit v 80 ml ultračisté vody. Doplnit do 100 ml. Uchovávat při laboratorní teplotě.

- **Hybridizační pufr**

500 µl formamidu, 500 µl 20 x SSC, 20 µl 10% SDS

- **Promývací pufry (připraveny ze zásobních ☺)**

I. 2x SSC + 0,1% SDS

II. 1x SSC

III. 0,1 x SSC

### 9.3 Tabulky

**Tabulka 11:** Izolovaná DNA ze sbírky prof. Bertaccini

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

**Tabulka 11:** pokračování

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

**Tabulka 12:** Izoláty DNA z hmyzích vektorů ze sbírky prof. Navrátila

kód	skupina 16Sr	vektor latinsky	vektor česky
75/35	X	<i>Cacopsylla pruni</i>	Mera slivoňová
75/52	X	<i>Cacopsylla pruni</i>	Mera slivoňová
202/6	XII	<i>Hyaesthes</i> <i>Obsoletus</i>	Žilnatka vironosná
216/5	XII	<i>Hyaesthes</i> <i>Obsoletus</i>	Žilnatka vironosná
267/17	I	<i>Dicranotropis hamata</i>	Ostruhovník škvorový
280/23	I	<i>Javesella pellucida</i>	Ostruhovník průsvitný

**Tabulka 13:** Rostlinné vzorky k izolaci sesbírané v okolí českých Budějovic (do 20 km)

kód	český název	latinský název	Izolovaná část	místo sběru (příp. původ)	izolace
101	<b>Jasan ztepilý</b>	<i>Fraxinus excelsior</i>	List	Horní Svince	DNA
102	<b>Řepka olejka</b>	<i>Brassica napus</i>	list+květenství	Dolní Svince	DNA/RNA
103	<b>Svlačec rolní</b>	<i>Convolvulus arvensis</i>	List	Dolní Svince	DNA/RNA
104	<b>Ořešák královský</b>	<i>Juglans regia</i>	List	Prostřední Svince	DNA
105	<b>Šeřík obecný</b>	<i>Syringa vulgaris</i>	List	Prostřední Svince	DNA
106	<b>Lilek rajče</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	List	Prostřední Svince	DNA
107	<b>Bez černý</b>	<i>Sambucus nigra</i>	List	Prostřední Svince	DNA
108	<b>Hrušeň obecná</b>	<i>Pyrus communis</i>	List	Dr. Lenz	DNA
109	<b>Bolševník obecný</b>	<i>Heracleum sphondylium</i>	List	Prostřední Svince	DNA
110	<b>Jetel plazivý</b>	<i>Trifolium repens</i>	List	Prostřední Svince	DNA
111	<b>Smetanka lékařská</b>	<i>Taraxacum officinale</i>	List	Prostřední Svince	DNA
112	<b>Jetel luční</b>	<i>Trifolium pratense</i>	List	Prostřední Svince	DNA/RNA
113	<b>Mířík celer</b>	<i>Apium graveolens</i>	List	Prostřední Svince	DNA
114	<b>Mrkev obecná</b>	<i>Daucus carota</i>	kořen + list	Prostřední Svince	DNA
115	<b>Zelí bílé hlávkové</b>	<i>Brassica oleracea var. alba</i>	List	Prostřední Svince	DNA
116	<b>Třapatka nachová</b>	<i>Echinacea purpurea</i>	List	Dr. Fránová	DNA/RNA
117	<b>Jabloň obecná</b>	<i>Malus domestica</i>	Lýko	Dr. Fránová	DNA/RNA



**Tabulka 14: Pozice jednotlivých prób na mikročipu.** Modře vyznačené buňky zvýrazňují próby pro detekci fytoplazem. Bílá pole představují próby pro detekci virů. Šedá pole s označením „Water“ slouží jako negativní kontrola. Každá buňka představuje dvojtečku (Autor: Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D., nepublikované údaje)

x	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	la	llc	llla2	IVa	567a2	Vla2	Vlla2	IXa	Xe	Xlla	PDV1	PNRSV5
<b>B</b>	lb	lld2	lllb2	IVb	Va	Vlb2	Vllb	IXb	Xf	Xllb	PDV4	PNRSV6
<b>C</b>	anti_la	anti_llc	anti_llla2	anti_IVa	Vb	Vlc	Vllc	IXc	Xg	Xllc	PDV5	PDV5
<b>D</b>	anti_lb	anti_lld2	anti_lllb2	anti_IVb	anti_567a2	Vld	anti_Vlla2	anti_IXa	anti_Xe	Xlld	PDV1	PDV4
<b>E</b>	ApMV1	ApMV2	ApMV3	ApMV5	anti_Va	anti_Vla2	anti_Vllb	anti_IXb	anti_Xf	anti_Xlla	Vla2	Xlla
<b>F</b>	ASPV1	PPV1	PNRSV1	ASPV3	anti_Vb	anti_Vlb2	anti_Vllc	anti_IXc	anti_Xg	anti_Xllb	Vlb2	Xllb
<b>G</b>	ASPV3	PNRSV1	PPV1	ASPV1	567a2	anti_Vlc	Xe	IXa	Vlla2	anti_Xllc	Vlc	Xllc
<b>H</b>	ApMV5	ApMV3	ApMV2	ApMV1	Va	anti_Vld	Xf	IXb	Vllb	PNRSV5	Vld	Xlld
<b>I</b>	la	llla2	llc	IVa	Vb	Water	Xg	IXc	Vllc	PNRSV6	anti_Vla2	anti_Xlla
<b>J</b>	lb	lllb2	lld2	IVb	anti_567a2	ASGV3	anti_Xe	anti_IXa	anti_Vlla2	ASGV1	anti_Vlb2	anti_Xllb
<b>K</b>	anti_la	anti_llla2	anti_llc	anti_IVa	anti_Va	ASGV2	anti_Xf	anti_IXb	anti_Vllb	ASGV2	anti_Vlc	anti_Xllc
<b>L</b>	anti_lb	anti_lllb2	anti_lld2	anti_IVb	anti_Vb	ASGV1	anti_Xg	anti_IXc	anti_Vllc	ASGV3	anti_Vld	Water

## 9.4 Sekvenování

**Sekvence 1:** Výsledek porovnání sekvence genu *rpS3* vzorku řepky olejky s nejpříbuznější sekvencí nalezenou v databázi NCBI.

```
>gi|543174593|gb|KF430808.1|:130-915'Brassica napus' phytoplasma clone
Brassica 8 S19 (rpsS) gene, partial cds; ribosomal protein L22 (rpLV)
gene, complete cds; and S3 (rpsC) gene, partial cds
Length: 1132
Score = 1445 bits(782), Expect = 0.0
Identities = 785/786(99%), Gaps = 1/786 (0%)
Strand = Plus/Plus
```

```
Query 1 GGAAAAATATTCACAAAGCTCAAGCCATTTTAACTTTTACCCTAAAGTAGCTGCTCCC 60
|
Sbjct 130 GGAAAAATATTCACAAAGCTCAAGCCATTTTAACTTTTACCCTAAAGTAGCTGCTCCC 189

Query 61 GTTATTTTAAACTTTTAAACAGTGTGTTTCCAATGCTGTTAATAATTTAAATTAAC 120
|
Sbjct 190 GTTATTTTAAACTTTTAAACAGTGTGTTTCCAATGCTGTTAATAATTTAAATTAAC 249

Query 121 CGCGAACAACCTTATGTTAAGAAGTTTTTGTCACGAAGGTTGCGTTTAAACGTATG 180
|
Sbjct 250 CGCGAACAACCTTATGTTAAGAAGTTTTTGTCACGAAGGTTGCGTTTAAACGTATG 309

Query 181 TTTCCAAGAGCTAAAGGTTCTGGTGATATGATTAaaaaaaGAACCAGCCACATTACTTTA 240
|
Sbjct 310 TTTCCAAGAGCTAAAGGTTCTGGTGATATGATTAaaaaaaGAACCAGCCACATTACTTTA 369

Query 241 GTAATAACTTCTAGCACAACTTGCAAAACATCAAAGGAGGAAGAACAAGTGGGTCAAAA 300
|
Sbjct 370 GTAATAACTTCTAGCACAACTTGCAAAACATCAAAGGAGGAAGAACAAGTGGGTCAAAA 429

Query 301 AACTAATCCTAACGGCTTAAGATTAGGCATTATTAGAAGTGGGAATCTCAATGGTGTGT 360
|
Sbjct 430 AACTAATCCTAACGGCTTAAGATTAGGCATTATTAGAAGTGGGAATCTCAATGGTGTGT 489

Query 361 TAATGATAAAGAAATTCCTAATTTAATTAAGAAGATTTTTTAATTCGTAAACTAATCAA 420
|
Sbjct 490 TAATGATAAAGAAATTCCTAATTTAATTAAGAAGATTTTTTAATTCGTAAACTAATCAA 549

Query 421 TAATTTACTTAAAAAAAGTGCTATCAGTCAAATGACATTGAACGCCTAAAAGAAAAAA 480
|
Sbjct 550 TAATTTACTTAAAAAAAGTGCTATCAGTCAAATGACATTGAACGCCTAAAAGAAAAAA 609

Query 481 taaaaaCCGTATCACTATTTCTGTCCACACCGCTAAACCAGGCGTTATTATTGGAAAAGA 540
|
Sbjct 610 TAAAACCGTATCACTATTTCTGTCCACACCGCTAAACCAGGCGTTATTATTGGAAAAGA 669

Query 541 TGGCGATACACGCAACAAATTAGTTGCCAAACTCAAAGAACTTACCMAAAAGACGTTAA 600
|
Sbjct 670 TGGCGATACACGCAACAAATTAGTTGCCAAACTCAAAGAACTTACCMAAAAGACGTTAA 729

Query 601 TCTTAACGTGTTAGAAGTTAAAAACTCTGATAAAATCGCTTTATTAATTGCTCAAAATAT 660
|
Sbjct 730 TCTTAACGTGTTAGAAGTTAAAAACTCTGATAAAATCGCTTTATTAATTGCTCAAAATAT 789

Query 661 GGCTGACAACCTAGAAAATCGTATGTTTTTCCGCCGTGTTCAAAAAATGGCAATCCAAAA 719
|
Sbjct 790 GGCTGACAACCTAGAAAATCGTATGTTTTTCCGCCGTGTTCAAAAAATGGCAATCCAAAA 849

Query 720 AGCCCTAAAAGCTGGTGCCAAAGGAGTAAAAACTTTAATTTCTGGTCGTTGGGTGGTGC 779
|
Sbjct 850 AGCCCTAAAAGCTGGTGCCAAAGGAGTAAAAACTTTAATTTCTGGTCGTTGGGTGGTGC 909

Query 780 TGAAAT 785
|
Sbjct 910 TGAAAT 915
```

**Sekvence 2:** Výsledek porovnání sekvence genu rpS3 vzorku jetele lučního s nejpříbuznější sekvencí nalezenou v databázi NCBI.

>gi|551703875|gb|KC354608.1| Clover phyllody phytoplasma isolate KVF ribosomal protein L2 gene, partial cds; ribosomal protein S19 and ribosomal protein L22 genes, complete cds; and ribosomal protein S3 gene, partial cds

Length: 1458

Score = 876 bits(474), Expect = 0.0

Identities = 479/481(99%), Gaps = 1/481(0%)

Strand = Plus/Minus

```

Query 1      TTTTGGGTAAGCTCTTTTATTTGGCAACTAATTTGTTGCGTGTATCGCCGCTTTTCCA 60
|
Sbjct 1032   TTTTGGGTAAGCTCTTTTATTTGGCAACTAATTTGTTGCGTGTATCGCCGCTTTTCCA 973

Query 61     ATAATAACGCCTGGTTTAGCGGTGTGGACAGAAATAGTGATACTGttttttattttttct 120
|
Sbjct 972     ATAATAACGCCTGGTTTAGCGGTGTGGACAGAAATAGTGATACTGTTTTTATTTTTTCT 913

Query 121    tttAGGCGTTCGATGTCAATTTGACTGATAGCGCtttttttagcaaaattattaattagt 180
|
Sbjct 912     TTTAGGCGTTCGATGTCAATTTGACTGATAGCGCTTTTTTtagcaaaattattaattagt 853

Query 181    ttacgaattaaaaaatcttctttaattaaattaggaatttctttaTCATTAACAAACCAT 240
|
Sbjct 852     TTACGAATTAATAAAATCTTCTTTAATTAAATTAGGAATTTCTTTATCATAACAAACCAT 793

Query 241    TGAGATTCCAAGTTCTAATAATGCCTAATCTTAAGCCGTTAGGATTAGTTTTTTGACCC 300
|
Sbjct 792     TGAGATTCCAAGTTCTAATAATGCCTAATCTTAAGCCGTTAGGATTAGTTTTTTGACCC 733

Query 301    ACTTTGTTCTTCCTCCTTTGATGTTTGCAAGTTTGTGCTAGAAAGTTATTACTAAAGTAAT 360
|
Sbjct 732     ACTTTGTTCTTCCTCCTTTGATGTTTGCAAGTTTGTGCTAGAAAGTTATTACTAAAGTAAT 673

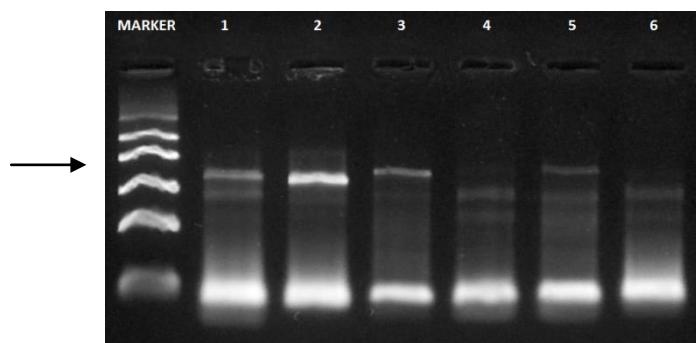
Query 361    GTGGCTGGTTCtttttttAATCATATCACCCGGAAACCTTTAGCTCTTGGAACATACGTT 420
|
Sbjct 672     GTGGCTGGTTCTTTTTTAATCATATCACCCAG-AAACCTTTAGCTCTTGGAACATACGTT 614

Query 421    TTAAACGCAAACCTTCGTTAACAAAACTTCTTTAACATAAAGTTGTTTCGCGGTTTAATT 480
|
Sbjct 613    TTAAACGCAAACCTTCGTTAACAAAACTTCTTTAACATAAAGTTGTTTCGCGGTTTAATT 554

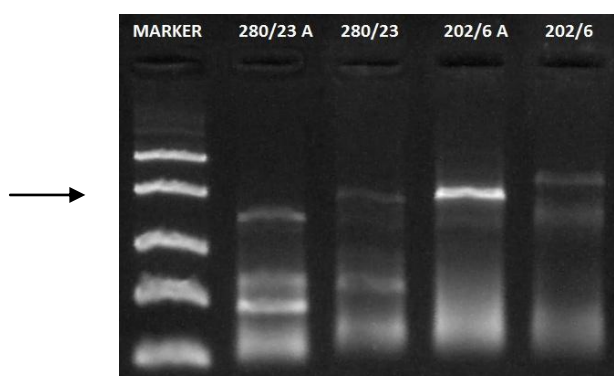
Query 481    T 481
|
Sbjct 553    T 553

```

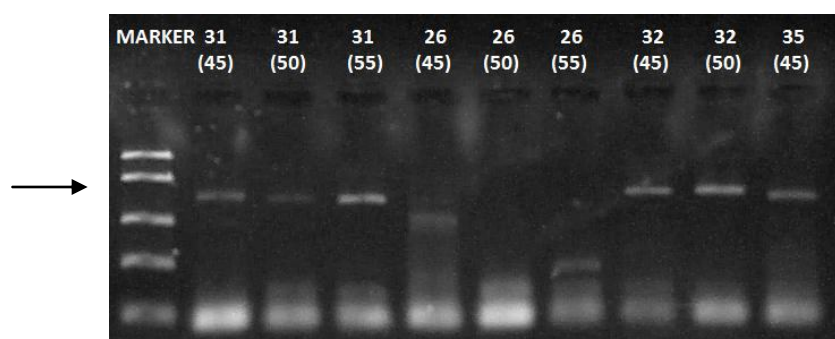
## 9.5 Elektroforetické snímky



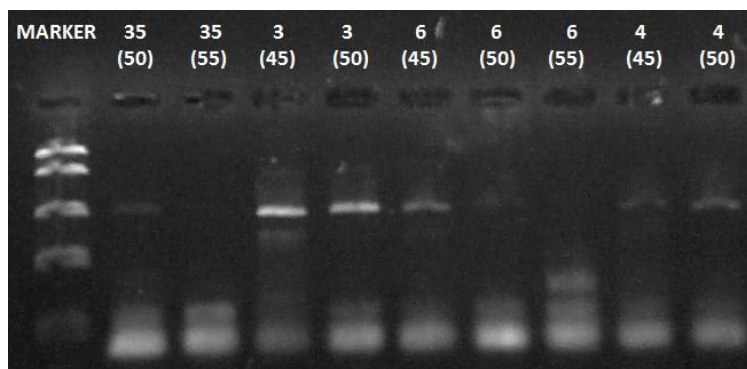
**Obrázek 32: Příklad amplifikace úseku rpS3 genu izolátu hmyzu.** Vzorek hmyzu 202/6 (sk. XII) kombinací různých primerů při teplotě annealingu 50 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . 1. F8 + F8bl + R4 (Cy5) + R4\_1 (Cy5), 2. F8 + F8bl + R4\_1 (Cy5), 3. F8bl + R4 (Cy5) + R4\_1 (Cy5), 4. F8bl + F8as + R4 (Cy5) + R4\_1 (Cy5), 5. F8bl + F8bs + R4 (Cy5) + R4\_1 (Cy5), 6. F8 + F8bl + R4 (Cy5). Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



**Obrázek 33: Příklad amplifikace úseku rpS3 genu izolátu hmyzu.** Vzorky hmyzu 280/23 (sk. I) a 202/6 (sk. XII) s primery F8 + R4\_1 (Cy5) (A) a F8as + R4 (Cy5) při teplotě annealingu 50 °C s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.

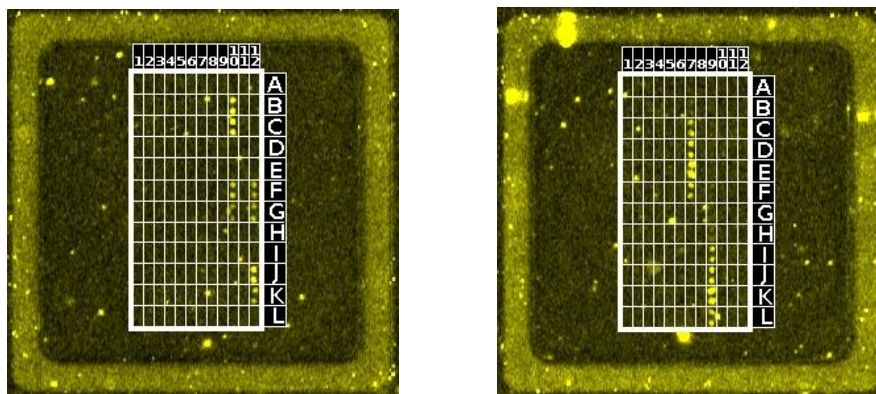


**Obrázek 34: Příklad amplifikace úseku rps3 genu fytoplazmové DNA ze sbírkových izolátů.** Vzorky 31 (sk. I-F), 26 (II-A), 32 (sk. III-A) a 35 (sk. V-A) při teplotách annealingu 45 – 55 °C (teplota uvedena v závorkách u jednotlivých vzorků v obrázku). Reakce s primery F8 + R4 (Cy5) s přidavkem 1  $\mu\text{l}$   $\text{Mg}^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.



**Obrázek 35: Příklad amplifikace úseku rps3 genu fytoplazmové DNA ze sbírkových izolátů.** Vzorky 35 (sk. V-A), 3 (VI), 6(sk. VII-A) a 4 (sk. IX) při teplotách annealingu 45 – 55 °C (teplota uvedena v závorkách u jednotlivých vzorků v obrázku). Reakce s primery F8 + R4 (Cy5) s přidavkem 1  $\mu$ l  $Mg^{2+}$ . Očekávaná délka produktů je naznačena šipkou.

## 9.6 Hybridizace



**Obrázek 36: Hybridizace.** Vlevo příklad hybridizace vzorku 13 (sk. XII) a vpravo vzorku 6 (sk. VII). Hybridizující sekvence byly připraveny primery F8 + R4 (Cy5).