

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Pavel Flídr

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Výskyt a molekulární charakteristika
fytoplazem vyvolávajících žloutenku pcháče
(*Cirsium arvense*)**

Bakalářská práce

Pavel Flídr

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením mého školitele prof. Milana Navrátila a že jsem pro její vypracování použil všechny uvedené zdroje.

V Olomouci dne:

Pavel Flídr

Tímto chci poděkovat svému školiteli prof. Milanu Navrátilovi za odborné vedení mé bakalářské práce a pomoc při získání a zpracování výsledků experimentální části mé práce, Mgr. Daně Šafářové za ochotnou pomoc při práci v laboratoři a také celému pracovnímu kolektivu laboratoře za utvoření příjemného pracovního prostředí.

Souhrn

Názvem fytoplazmy jsou označovány nehelikální prokaryotní organismy postrádající pevnou buněčnou stěnu, osidlující floém rostli a jsou přenášeny hmyzími vektory. Tyto patogeny řadíme do třídy *Mollicutes*. Vzhledem k jejich podobnosti k živočišným mykoplazmatům byly v minulosti označovány pojmem mycoplasma-like organisms (MLOs). Od roku 1994 jsou podle taxonomických pravidel jednotlivé druhy fytoplazem označovány *Candidatus* Phytoplasma. Na základě sekvenční analýzy 16S rRNA genu byly fytoplazmy rozříděné do několika skupin.

Fytoplazmy napadají mnoho planých druhů rostlin i ekonomicky významných plodin. Choroby způsobené fytoplazmami významně ovlivňují výnosy a kvalitu úrody. Mezi příznaky nemocí způsobených fytoplazmami patří chloróza, deformace listů, zakrslý růst nebo proliferace.

Tato práce studuje výskyt a molekulární charakteristiku fytoplazem vyskytujících se na plevelných rostlinách, hlavně pak na pcháči (*Cirsium arvense*) a svlačci (*Convolvulus arvensis*).

Na pcháči byly detekované fytoplazmy skupin Aster yellows 16SrI, Western X-disease 16SrIII, Stolbur 16SrXII a Bermuda grass white leaf 16SrXIV. Na svlačci (*Convolvulus arvensis*) byly detekovány fytoplazmy skupin Western X-disease 16SrIII, Elm yellows group 16SrV a Stolbur 16SrXII.

Summary

The trivial name phytoplasma designate wall-less non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and they are spread by insect vectors. These pathogens belong to class *Mollicutes*. Phytoplasmas had been called Mycoplasma-like organisms (MLOs) for a long time because of their similarities to the mycoplasmas that are animal pathogens. According to taxonomic rules phytoplasma genus are assigned as *Candidatus* phytoplasma since 1994. Based on sequence analysis of 16S rRNA gene phytoplasmas were divided into several groups.

Phytoplasmas are associated with many diseases of wild plants as well as economically important food. Main symptoms of phytoplasma infection are chlorosis, leaf deformation, proliferation or dwarf growth.

Objective of this study is occurrence and molecular identification of phytoplasmas associated with wild plant diseases, mainly Canadian thistle (*Cirsium arvense*) and Field bindweed (*Convolvulus arvensis*).

On the *Cirsium arvense*, they were detected phytoplasmas belong to Aster yellows group 16SrI, Western X-disease group 16SrIII, Stolbur group 16SrXII, and Bermuda grass white leaf group 16SrXIV. On the *Convolvulus arvensis*, they were detected phytoplasmas belong to Western X-disease group 16SrIII, Elm yellows group 16SrV and Stolbur group 16SrXII.

Obsah

1 Cíle práce	8
2 Úvod	9
3 Literární přehled	10
3.1 Fytoplazmy jako intrabuněčné rostlinné patogeny	10
3.2 Laboratorní metody detekce fytoplazem	11
3.3 Charakteristika fytoplazem	12
3.3.1 Buňky fytoplazem	12
3.3.2 Genom fytoplazem	12
3.4 Taxonomie fytoplazem	13
3.5 Fytoplazmy vyskytující se na pcháči	15
3.5.1 Aster yellows group 16SrI	15
3.5.2 X – disease group 16SrIII	16
3.5.3 Elm yellows group 16SrV	17
3.5.4 Rice yellow dwarf group 16SrXI	18
3.5.5 Stolbur group 16SrXII	18
3.5.6 Bermuda Grass White Leaf (BGWL) group 16SrXIV	19
4 Materiál a metody	20
4.1 Materiál	20
4.2 Izolace DNA	21
4.3 PCR amplifikace	21
4.3.1 Direct PCR	21
4.3.2 Nested PCR	23
4.3.3 Gelová elektroforéza	24
4.3.4 Izolace DNA z gelu	25
4.4 Transformace bakterií <i>E.coli</i>	26
4.4.1 Ligace DNA do plazmidu	26
4.4.2 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	26
4.4.3 Test kolonií pomocí colony PCR reakce	27
4.4.4 Příprava bakteriální konzervy	28
4.5 Sekvencování	28
4.6 Příprava pracovních roztoků	29
4.7 Přístrojové vybavení laboratoře	30
5 Výsledky	31
6 Diskuze	43
7 Závěr	44
8 Seznam použité literatury	45

1 Cíle práce:

Cílem mé bakalářské práce je:

- 1) Shromáždit dostupnou literaturu a vypracovat literární rešerši na téma výskyt a molekulární charakteristika fytoplazem vyskytujících se na pcháči (*Cirsium arvense*).
- 2) Detekce a identifikace fytoplazem ve vzorcích plevelů, zejména pcháče (*Cirsium arvense*) pomocí PCR reakce.

2 Úvod

Tato práce se zabývá studiem výskytu a molekulární charakteristiky fytoplazem vyskytujících se na pcháči *Cirsium arvense* a jejich detekcí a identifikací pomocí dostupných laboratorních metod. Vedle pcháče studuje výskyt fytoplazem i na dalších plevelných rostlinách a to na svlačci rolním (*Convolvulus arvensis*), kokošce pastuší tobolce (*Capsella bursa-pastoris*) a lebedě lesklé (*Atriplex sagittata*).

Fytoplazmy jsou prokaryotní organismy s velmi specifickou buněčnou stavbou a životními nároky. Napadají sítkovce rostlin a hmyz, kterým jsou přenášeny. Tyto patogeny byly objeveny v šedesátých letech minulého století, ale nemoci rostlin jimi způsobené byly popsány již mnohem dříve. Nákaza rostlin fytoplazmami se projevuje rozmanitými příznaky jako např. chloróza a deformace listů, proliferace nebo zakrslý růst. Příznaky infekce jsou různé v závislosti na druhu patogena, druhu infikovaného hostitele nebo také na odlišné vnímavosti jednotlivých hostitelských rostlin k infekci patogenem.

Studium chorob způsobených fytoplazmami, takzvaných fytoplazmóz, je důležité z důvodu jejich ekonomického dopadu. Fytoplazmy totiž napadají mimo jiné mnoho ekonomicky významných druhů kulturních plodin a způsobují citelné snížení kvality i množství úrody. Tím způsobují zemědělcům škody větší než malé.

Fytoplazmy lze detekovat velkým množstvím biologických a molekulárních metod. V této práci byla provedena molekulární detekce pomocí PCR amplifikace a následné analýzy sekvence produktů reakce.

3 Literární přehled

3.1 Fytoplazmy jako intrabuněčné rostlinné patogeny

Fytoplazmy reprezentují zřetelně odlišnou monofyletickou skupinu organismů patřící do třídy *Mollicutes*, oddělení *Tenericutes* (Schneider *et al.*, 1993).

Tyto patogeny osídlují lýko rostlin, hemolymfu a slinné žlázy hmyzích vektorů sajících floémovou šťávu (IRPCM, 2004). Fytoplazmy jsou přenášeny hmyzími vektory a to převážně zástupci rodů mery (*Psillidae*), křísi (*Auchenorrhyncha*) a ploštice (*Miridae*) (Seemüller a Schneider, 2004).

Jedná se o jednoduché nehelikální prokaryotní organismy postrádající pevnou buněčnou stěnu, které lze pozorovat v elektronovém mikroskopu. Dnešní poznatky o fytoplazmách jsou prakticky omezeny na molekulární data. Vzhledem k jejich specifickým životním podmínkám totiž není možné kultivovat fytoplazmy *in vitro* (IRPCM, 2004).

Fytoplazmy jsou spojovány s množstvím chorob planých ale i kulturních plodin, například píceňin a ovocných dřevin. Tímto se stávají ekonomicky velmi významnou skupinou rostlinných patogenů (Fránová *et al.*, 2007).

Poprvé se s fytoplazmami setkáváme v šedesátých letech dvacátého století, kdy Doi *et al.* (1967) pozorovali v lýku aster vykazujících žloutenku oválné buňky bez buněčné stěny. Tyto unikátní organismy byly z důvodu morfologické a ultrastrukturální podobnosti k živočišným mykoplazmatům nazvány MLOs (zkratka anglického termínu „mycoplasma-like organisms“). Po další tři desetiletí byly prováděny neúspěšné pokusy o izolaci a kultivaci MLOs *in vitro*. Nemožnost kultivace velmi ztěžovala charakterizaci MLOs a jejich taxonomické zařazení, proto nebylo dlouho jisté, zda všechny MLOs patří do třídy *Mollicutes*. Přesto byly tyto organismy na základě buněčné charakteristiky a pozdějšího studia 16S rRNA do třídy *Mollicutes* zařazeny (Gundersen *et al.*, 1994).

Roku 1992 byl na devátém kongresu Mezinárodní organizace pro mykoplasmologii týmem IRPCM přijat jako označení všech MLOs název fytoplazma. Od roku 1994 se podle nových taxonomických pravidel označují rody fytoplazem 'Candidatus Phytoplasma' (IRPCM, 2004).

3.2 Laboratorní metody detekce fytoplazem

Dříve byla detekce fytoplazem založena na fluorescenční a elektronové mikroskopii. Pro jednoduchost a nízké provozní náklady byla nejrozšířenější metodou detekce fytoplazem fluorescenční mikroskopie, kdy se tenké řezy fixovaných vzorků barví DNA fluorochromem DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol.2HCl). Přítomnost fytoplazem značí modro-bíle fluoreskující body v sítkovicích. Elektronová mikroskopie je finančně a technicky náročná a úspěšná pouze u hostitelů s vysokým titrem fytoplazem. U těchto metod však nelze na základě morfologie částic určit druh fytoplazem (Ahrens *et al.*, 1992).

Vedle mikroskopických metod bylo možné u vzorků s vysokou koncentrací fytoplazem využít také metody imunochemické, zejména pak různé varianty ELISA testu. Metoda se však pro nedostupnost specifických protilátek nerozšířila.

Díky rozvoji DNA hybridizačních metod se v poslední době rozšířily pro detekci fytoplazem molekulární metody. Řadí se mezi ně hybridizace, polymerázová řetězová reakce (PCR), délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP) a sekvencování. Dnes je pro jednoduchost a možnost dalších fylogenetických studií nejpoužívanější PCR amplifikace 16S rRNA genu s následnou RFLP analýzou nebo sekvencováním (Ahrens a Seemüller, 1992).

Fránová *et al.*, (2007) hodnotí PCR reakci jako nejcitlivější vysoce specifickou a rychlou metodu detekce fytoplazem. Také uvádí nevýhody metody, které vidí v možném výskytu nespecifických reakcí, falešných pozitivit a falešných negativit. Přesto se zdá být použití PCR reakce s univerzálními i skupinově specifickými primery s následnou RFLP analýzou nebo sekvencováním správnou cestou pro identifikaci fytoplazem. Citlivost PCR techniky lze kvůli nízkému titru fytoplazem ve vzorku zvýšit metodou nested PCR, kdy produkt reakce PCR slouží jako templát pro následující amplifikaci (Khan *et al.*, 2004).

V posledních letech přinesla nové možnosti v detekci fytoplazem kvantitativní (real-time) PCR. Tato metoda umožňuje sledovat změnu koncentrace PCR produktu v jednotlivých cyklech reakce a pomocí vloženého standardu určit množství templátové DNA ve vzorku (Christensen *et al.*, 2004).

Pro klasifikaci fytoplazem podle symptomů se dříve používaly biologické testy na indikátorech. Fytoplazmy byly například přenášeny na experimentálního hostitele

Catharanthus roseus (barvínek růžový). Dnes se testy na biologických indikátorech často používají například pro certifikaci ovocných dřevin (Navrátil a Fialová, 2008).

3.3 Charakteristika fytoplazem

3.3.1 Buňky fytoplazem

Prokariotní fytoplazmy jsou rostlinné patogeny, jejichž buňky postrádají pevnou buněčnou stěnu. Povrch buňky tvoří jednotková plazmatická membrána. Pozorováním elektronovým mikroskopem bylo zjištěno, že tvar buněk je pleiomorfní. Objevují se kulovité, oválné až protáhlé buňky. Jejich velikost je velice proměnlivá, pohybuje se od 100 do 800 μm , jsou tedy významně menší než typická bakteriální buňka (Suzuki *et al.*, 2005).

Buňky jsou citlivé na antibiotika skupiny tetracyklínů, ale ne na penicilin. Použití antibiotik u napadené tkáně pouze oslabí příznaky, rostlinu však plně nezdraví. Dále jsou fytoplazmy rezistentní vůči působení digitoninu a vzhledem k jejich hypertonickému životnímu prostředí jsou citlivé na hypotonický roztok (IRPCM, 2004).

3.3.2 Genom fytoplazem

Většina fytoplazem má podobně jako bakterie uspořádaný genom do cirkulárního chromosomu. Výjimku tvoří druh '*Candidatus Phytoplasma mali*' způsobující proliferaci jabloně, který má DNA uspořádanou v chromozomu lineárním (Kube *et al.*, 2008).

Velikost genomu organismů třídy *Mollicutes* se pohybuje mezi 600 – 2200 kb (Marcone *et al.*, 1999), přičemž velikost genomu rodu '*Candidatus Phytoplasma*' je omezena na 530 – 1350 kb. Podle Oshimy *et al.* (2004) je genom fytoplazem svou velikostí minimální genom zajišťující životní pochody parazita. Kóduje ještě méně metabolických funkcí než genom živočišných mykoplazmat. Fytoplazmám chybí geny např. pro cyklus trikarboxylových kyselin, geny pro syntézu nukleotidů a aminokyselin nebo také geny pro fosfotransferázový systém.

Všechny organismy rodu '*Ca. Phytoplasma*' obsahují unikátní sekvenci regionu 16S rRNA genu CAAGAYBATKATGTKTAGCYGGDCT IRPCM (IRPCM, 2004).

Podle výsledků centrifugace v hustotním gradientu bylo zjištěno, že genom zástupců '*Ca. Phytoplasma*' obsahuje relativně nízký obsah guaninových a cytosinových bází, a to přibližně jen 23 – 29 % (Razin, 1992).

Zástupci rodu '*Ca. Phytoplasma*' používají UGA kodon jako stop kodon, nikoli jako kodon kódující tryptofan. Společně s předpokládaným ancestrálním předkem *Acholeplasma laidlawii* používají pro tryptofan kodon UGG (Bertaccini, 2007).

Bertaccini (2007) dále popisuje možnost rozlišení fytoplazem od živočišných mykoplazmat díky přítomnosti spacer regionu o délce přibližně 300 bp mezi 16S a 23S rDNA oblastí. Tato oblast kóduje transferovou RNA pro izoleucin a část transferové RNA pro alanin.

3.4 Taxonomie fytoplazem

V současnosti jsou fytoplazmy řazeny do patnácti skupin na základě sekvenční analýzy 16SrDNA. V rámci každé z patnácti skupin byl určen referenční druh označený '*Candidatus Phytoplasma*' reprezentovaný referenčním izolátem (viz Tab. 1). Do jednotlivých druhů lze fytoplazmu zařadit tehdy, splňuje-li pravidla pro taxonomii fytoplazem zavedená IRPCM v roce 2004 (IRPCM, 2004).

Sekvenční homologie izolátů v rámci jednoho druhu '*Candidatus Phytoplasma*' musí být rovna nebo vyšší než 97,5%. Nová pravidla také umožňují popsat nový druh na základě rozdílných biologických (hmyzí vektor), fytopatologických (specifita rostlinných hostitelů a příznaky) a molekulárních (velikost genomu) charakteristik i v případě, že sekvenční homologie je větší nebo rovna 97,5% ve srovnání s již existujícím druhem '*Candidatus Phytoplasma*'.

Tab. 1: Přehled fylogenetických skupin fytoplazem a jejich referenčních izolátů (IRPCM, 2004)

Fylogenetická skupina	Druh '<i>Candidatus Phytoplasma</i>'	GenBank Ac. No.
Aster yellows group 16SrI	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '	M30790
	' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '	AB010425
Peanut witches'- broom group 16SrII	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '	U15442
X-disease group 16SrIII	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> '	L04682
Coconut lethal yellowing group 16SrIV	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> '	U18747
	' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> '	X80117
	' <i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> '	Y14175
	' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '	AB055986
Elm yellows group 16SrV	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '	AY072722
	' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> '	AF176319
	' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	AF122910
Clover proliferation group 16SrVI	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	AY390261
Ash yellows group 16SrVII	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	AF092209
Loofah witches'- broom group 16SrVIII	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '	AF086621
Pigeon pea witches'-broom group 16SrIX	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	AF515636
Apple proliferation group 16Srx	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	AJ542541
	' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	AJ542543
	' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	AJ542544
	' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	X92869
	' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '	X76431
	' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '	AY135523
Rice yellow dwarf group 16SrXI	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	D12581
Stolbur group 16SrXII	' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	L76865
	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	AF248959
BGWL group 16SrXIV	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	AJ550984
' <i>Ca. Phyt. brasiliense</i> ' group 16SrXV	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '	AF147708

3.5 Fytoplazmy vyskytující se na pcháči

Pcháč oset (*Cirsium arvense*) je fialově kvetoucí plevelná rostlina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) dorůstající výšky 120cm. (Dostál, 1989)

Podle dostupných literárních pramenů je pcháč napadán fytoplazmami několika skupin, a to fytoplazmami žloutenky aster 16SrI (Jomantiene *et al.*, 1999), fytoplazmami skupiny western x-disease 16SrIII podskupiny 16SrIII B (Rančič *et al.*, 2005), fytoplazmami skupiny Stolburu 16SrXII (Navrátil *et al.*, 2008) a fytoplazmami skupiny Bermuda grass white leaf 16SrXIV (Marcone *et al.*, 2004). Dále se na pcháči dle předběžné analýzy vyskytují fytoplazmy skupiny Rice yellow dwarf 16SrXI a fytoplazmy skupiny Elm yellows 16SrV (Navrátil ústní sdělení).

3.5.1 Aster yellows group 16SrI

Skupina fytoplazem Aster yellows 16SrI je spojována s velkým množstvím ekonomicky významných nákaz a její členové jsou rozšíření po celém světě. V rámci všech skupin fytoplazem má právě 16SrI skupina nejvyšší diverzitu. Na základě analýzy 16S rDNA, *tuf* genu a operonu ribozomálního proteinu (*rp*) byla celá Aster yellows skupina rozdělena do několika podskupin.

Jako referenční izoláty byly vybrány '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (zkráceně AY) řazená do podskupiny 16SrI-B (GenBank Ac. No. M30790 a M74770) a '*Candidatus Phytoplasma japonicum*' (GenBank Ac. No. AB010425) (IRPCM, 2004).

Izoláty fytoplazem řazené do podskupin Aster yellows group 16SrI-A, 16SrI-B a 16SrI-C jsou rozšířené po celém světě a napadají více než 80 rostlinných druhů. Podobná variabilita je zaznamenána i u hmyzích vektorů, fytoplazmy těchto podskupin jsou přenášeny až 30 druhy hmyzu. Podskupina 16SrI-B tvoří v rámci skupiny největší a nejdiverzifikovanější podskupinu. U podskupin 16SrI-L a 16SrI-M se zdá, že je geografické rozšíření omezeno na oblast Evropy. Členové ostatních podskupin mají obvykle úzký okruh rostlinných hostitelů i hmyzích vektorů a nemoci jimi způsobené mají omezený geografický areál.

Fytoplazmy řazené do skupiny Aster yellows napadají převážně rostliny třídy dvouděložných (*Magnoliopsida*). Některé izoláty však napadají i ekonomicky významné rostliny třídy jednoděložných (*Liliopsida*) jako jsou kukuřice, cibule, oves a některé traviny. Malá část izolátů také způsobuje choroby dřevin jako je santal,

broskvoň, moruše nebo také brusnice. Experimentálně bylo zjištěno, že severoamerické AY fytoplazmy (podskupiny 16SrI-A, 16SrI-B a 16SrI-C) byly vektory přeneseny na 191 rostlinných druhů z 42 čeledí. Hlavními hmyzími vektory přenášejícími AY fytoplazmy jsou zástupci čeledi křískovití (*Cicadellidae*), a to zejména zástupci rodů *Marcosteles*, *Euscelis*, *Scaphytopius* a *Aphrode* (Lee *et al.*, 2004).

Příznaky infekcí se různí podle izolátů. Jako hlavní však lze označit virescenci, fyloidie, různé malformace a pruhování květu, žloutnutí a kroucení listů, elongace a etiolizace internodií. Infikované rostliny mohou vykazovat pouze některé symptomy.

Druh '*Candidatus Phytoplasma asteris*' je charakterizován několika unikátními sekvencemi 16S rRNA regionu a to 5'-GGGAGGA-3' na pozici 226-232 podle GenBank Ac. No. M30790, 5'-CTGACGGTACC-3' (476-485) a 5'-CACAGTGGAGG TTATCAGTTG-3' (1008-1028). Dále jsou pro druh charakteristické unikátní sekvence ribozomálního proteinu *rpl22* 5'-CCGCGAACAACCTT (218-230), 5'-AGTAA TAAC TTCTAGCACAACTTGC -3' (338-363) a sekvence proteinu *rps3*: 5'-AAAGAAGAT TTTTAAATTC-3' (114-133) a 5'-CTAGAAAATCGTATG-3' (396-310) (Lee *et al.*, 2004).

Do skupiny 16SrI byl zařazen také izolát nazvaný Cirsium yellows phytoplasma, GenBank Ac. No. AF200431 izolovaný z pcháče (*Cirsium arvense*) (Jomantiene *et al.*, 1999 nepublikováno).

3.5.2 X – disease group 16SrIII

Pro skupinu fytoplazem X disease group byl jako referenční izolát vybrán '*Candidatus Phytoplasma pruni*' známý též pod synonymem Western X-disease mycoplasma-like organism. V databázi GenBank má referenční číslo L04682 (Schneider *et al.*, 1992).

Fytoplazmy této skupiny způsobují ekonomicky významnou chorobu zvanou Western X-disease. Choroba napadá ovocné stromy, zvláště pak decimuje porosty broskvoní a třešní. Izolát zvaný Western X-disease phytoplasma je přenášený vektory *Colladonus montanus*, *Scaphytopius acutus*, v menší míře pak *Calladonus geminatus* nebo *Fieberiella florii*. Rozšířený je hlavně v USA a Kanadě. Mezi příznaky infekce patří žlutá skvrnitost, svinování listů, v pozdějším stádiu chlorotický vzhled stromu a opad listů. Zasažené stromy plodí velmi málo nebo neplodí vůbec.

Izolát řazený do této skupiny byl z pcháče (*Cirsium arvense*) izolován například v Srbsku. Zasažené rostliny vykazovaly nerovnoměrný růst, atypické větvení a malé listy. Dále pak zkrácená internodia, chlorózu listů a celkovou povadlost. O možném přenašeči se autor nezmiňuje (Rančič *et al.*, 2005). Další fytoplazmy řazené do této skupiny izolované z pcháče lze nalézt pod synonymy *Cirsium white leaf phytoplasma rrnB* (GenBank Ac. No. AF373106) a *Cirsium white leaf phytoplasma rrnA* (GenBank Ac. No. AF373105) (IRPCM, 2004).

3.5.3 Elm yellows group 16SrV

Pro 16SrV skupinu bylo ustanoveno hned několik druhů '*Candidatus Phytoplasma*'. Prvním referenčním izolátem je '*Candidatus Phytoplasma ziziphi*' (GenBank Ac. No. AY072722) známý také pod jménem *Ziziphus jujube witches'-broom phytoplasma*. Dalšími jsou '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (GenBank Ac. No. AF176319) zvaná též Flavescence dorée phytoplasma a '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' (GenBank Ac. No. AF122910) se synonymem Elm yellows phytoplasma EY1 (IRPCM, 2004).

16SrV skupina reprezentuje třetí největší skupinu fytoplazem s velkou rozmanitostí izolátů, jejich rostlinných hostitelů i hmyzích vektorů. Geograficky jsou zástupci této skupiny rozšířené v Americe, Evropě i Asii. Způsobují ničující choroby jilmu, vinné révy, ostružiníků, třešní, broskvoní a mnoha dalších rostlin.

'*Candidatus Phytoplasma ulmi*' jako referenční izolát EY1 napadá převážně dřeviny rodu *Ulmus*. Výskyt tohoto druhu je typický pro oblast Kanady a USA. Prvním příznakem napadení rostliny je odumírání kořínků. Na listech se infekce projeví žloutnutím a předčasným opadem. Stromy hynou obvykle následující rok po napadení. Hlavním přenašečem je křísek *Scaphoideus luteolus* původem ze Severní Ameriky.

'*Candidatus Phytoplasma ulmi*' je charakterizována unikátními sekvencemi 16S rRNA 5'-GGAAA-3' (327-835) a 5'-CGTTAGTTGCC-3' (1098-1108), sekvencemi ribozomálního proteinu *rpl22-rps3* 5'-TTACGCTTGCC-3' (284-294), 5'-CATT TAA TAAAATTGCTATT-3' (739-758) a 5'-AAATTCTATTTCTATGGGAAT-3' (910-932) a také sekvencemi *SecY* genu 5'-TTTGATCCAATGTAA-3' (350-365), 5'-GTCTTTCGGTCATGGATTGA-3' (595-614), 5'-ATTTAGTCTAAT-3' (616-627) a 5'-CAAATAGAACAA-3' (1053-1064) (Lee *et al.*, 2004).

3.5.4 Rice yellow dwarf group 16SrXI

Referenční izolát pro skupinu fytoplazem Rice yellow dwarf byl nazván '*Candidatus Phytoplasma oryzae*' (GenBank Ac. No. D12581 a AB052873). Jedná se o poměrně nový taxon spojující fytoplazmy asociované se žlutou zakrslostí rýže, zkráceně RYD (Rice yellow dwarf).

RYD Fytoplazmy infikuje hlavně rýži (*Oryza sativa*). Napadeným rostlinám výrazně žloutnou listy, ty se kroutí a nakonec odumírají. To má za následek zakrslý vzrůst a slabou produkci zrna. RYD fytoplazma je přenášena merami *Nephotettix cincticeps*, *Nephotettix virescens* a *Nephotettix nigropictus*. Fytoplazmy se objevují v mnohých asijských zemích produkujících rýži (Jung *et al.*, 2003).

Fytoplazma sekvenčně zařazena do 16SrXI skupiny byla také detekována v západní Keňi na sloní trávě (*Pennisetum purpureum*). Sloní tráva je původní travina tropické Afriky dorůstající výšky 3 až 5 metrů. Používá se jako krmivo a jako nástroj ochrany prostředí. Napadené rostliny vykazují žloutnutí a zakrslost listů, proliferaci odnoží a zkracování internodií. Sekvence této fytoplazmy jsou k dispozici v GenBank databázi pod Ac. No. AY377874 až AY37787. Hmyzí vektor není pro tento izolát zatím znám (Jones *et al.*, 2004).

Jung *et al.* (2003) dále charakterizuje unikátní sekvence pro izoláty zahrnuté do druhu '*Candidatus Phytoplasma oryzae*'. Jedná se o sekvence unikátního regionu 16S rDNA a to 5'-AACTGGATAGGAAATTTAAAAGGT-3' a 5'-ATGAGACTGCCAATA-3'. Na pcháči (*Cirsium arvense*) nebyly dosud fytoplazmy skupiny 16SrXI detekovány, avšak z výsledků předběžné analýzy vzorků pcháče vyplynula možnost výskytu fytoplazem skupiny 16SrXI na tomto plevelu.

3.5.5 Stolbur group 16SrXII

Referenčními izoláty skupiny Stolbur group 16SrXII jsou '*Candidatus Phytoplasma australiense*' (GenBank Ac. No. L76865), '*Candidatus Phytoplasma solani*' (GenBank Ac. No. AF248959) známá také pod synonymem Stolbur phytoplasma, '*Candidatus Phytoplasma caricae*' (GenBank Ac. No. AY725234), '*Candidatus Phytoplasma fragariae*' (DQ086423), '*Candidatus Phytoplasma graminis*' (GenBank Ac. No. AY725228) a '*Candidatus Phytoplasma persicae*' (GenBank Ac. No. AY787137) (IRPCM, 2004).

Mezi hostitelské rostliny fytoplazem skupiny stolburu patří např. rajče (*Lycopersicon esculentum*), paprika (*Capsicum annum*), réva vinná (*Vitis vinifera*), lilek brambor (*Solanum tuberosum*) a z plevelných rostlin potom svlačec (*Convolvulus arvensis*), jetel (*Trifolium* spp.) nebo také pcháč (*Cirsium arvense*) (Navrátil a Fialová, 2008).

V České republice se běžně vyskytuje fytoplasma 'Candidatus Phytoplasma solani', který se vyskytuje ve velké části Evropy a v Asii. Na různých hostitelích je fytoplazmóza provázána různými příznaky. Brambor vykazuje při nákaze zelenokvětost, žloutnutí a předčasné vadnutí listů. U dalších hostitelů dochází k zakrslosti, zkrácení internodií a různým defektům plodů.

Významným vektorem pro oblast Evropy je křísek žilnatka vironosná (*Hyalestes absolutes*). Jako další přenašeče lze uvést *Aphrodes bicinctus* nebo *Lygus pratensis*.

3.5.6 Bermuda grass white leaf group 16SrXIV

Za referenční izolát Bermuda grass white leaf (BGWL) skupiny byl vybrán 'Candidatus Phytoplasma cynodontis' (GenBank Ac. No. AJ550984) známý též jako Bermuda grass white leaf phytoplasma.

Hlavním hostitelem této fytoplazmy je troskut prstnatý (*Cynodon dactylon*). Fytoplazmóza byla poprvé detekována na Taiwanu. Známa je také z mnohých zemí Asie, Súdánu a z Itálie. Infekce se na rostlině projeví lehkou chlorózou, proliferací postranních výhonků, hustým habitem, zakrněním rostliny a nakonec rostlina hyne (Marcone *et al.*, 2004).

Izolát fytoplazmy blízké příbuzný fytoplazmám skupiny BGWL byl také detekován v Malaisii, kde způsoboval žloutenku a chřadnutí kokosovníku ořechoplodého (*Cocos nucifera*). Marcone *et al.* (2004) poukazují na detekci fytoplazem ze skupiny Bermuda grass white leaf na dvou zástupcích dvouděložných rostlin a to na pcháči (*Cirsium arvense*) a *Galactia tenuifolia*. Dále udává jako možného přenašeče kříška *Psammotettix cephalothes*.

'Candidatus Phytoplasma cynodontis' je charakterizována unikátní sekvencí 16S rRNA regionu 5'-AATTAGAAGGCATCTTTAAT-3' (Marcone *et al.*, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro experimentální část byly vybrány vzorky plevelů druhů pcháč oset (*Cirsium arvense*), svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*), lebeda lesklá (*Atriplex sagittata*) a vzorek bramboru (*Solanum tuberosum*) (Tab. 2). Vzorky byly sebrány na pozemcích farmy Puchala, lokalita Lednice. Sběr byl proveden ve dnech 23. 4. 2007 až 2. 5. 2007. Vzorky rostlin byly zamraženy v -80°C.

Tab. 2: Seznam analyzovaných vzorků sebraných na lokalitě Lednice, farma Puchala

Číslo vzorku	Druh rostliny	Příznaky
689	<i>Cirsium arvense</i>	
690	<i>Cirsium arvense</i>	
691	<i>Cirsium arvense</i>	
72	<i>Convolvulus arvensis</i>	chloróza, proliferace
73	<i>Convolvulus arvensis</i>	proliferace
74	<i>Convolvulus arvensis</i>	
75	<i>Convolvulus arvensis</i>	chloróza, červenání listů
76	<i>Convolvulus arvensis</i>	proliferace
77	<i>Cirsium arvense</i>	chloróza
78	<i>Cirsium arvense</i>	
79	<i>Convolvulus arvensis</i>	
80	<i>Convolvulus arvensis</i>	
81	<i>Convolvulus arvensis</i>	
82	<i>Convolvulus arvensis</i>	chloróza
83	<i>Convolvulus arvensis</i>	chloróza
84	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	chloróza, drobné listy
85	<i>Convolvulus arvensis</i>	
86	<i>Cirsium arvense</i>	
87	<i>Convolvulus arvensis</i>	
88	<i>Cirsium arvense</i>	mírná chloróza
89	<i>Convolvulus arvensis</i>	
90	<i>Cirsium arvense</i>	
91	<i>Cirsium arvense</i>	chloróza
92	<i>Convolvulus arvensis</i>	světle zelené zbarvení
93	<i>Solanum tuberosum</i>	mírná chloróza
94	<i>Cirsium arvense</i>	
95	<i>Cirsium arvense</i>	
96	<i>Cirsium arvense</i>	
97	<i>Atriplex sagittata</i>	
98	<i>Convolvulus arvensis</i>	

4.2 Izolace DNA

Z listů zamražených vzorků (-80°C) byly skalpelem odděleny části s cévními svazky (asi 1g). Tyto byly následně homogenizovány ve vychlazené třecí misce za přídavku mořského písku a přibližně 20 ml pracovního roztoku pufru Delaporta 1x. Po homogenizaci byl vzorek přelit do 30ml centrifugační kyvety a centrifugován na MR 22 4 min při 1000 g. Supernatant byl přelit přes uhelon do čisté vychlazené 30ml centrifugační kyvety a centrifugován na MR 22 25 min při 14000 g a teplotě 4°C, čímž došlo k sedimentaci fytoplazmózní DNA. Pro extrakci nukleových kyselin byl takto vzniklý sediment resuspendován ve 2 ml směsi Doyle-Doyle pufru a merkaptoetanolu o teplotě 60°C (roztok vznikl smísením 15ml Doyle-Doyle pufru s 30 µl merkaptoethanolu) a vzorky byly inkubovány 20 min při teplotě 60°C. Přídavkem 2 ml chloroform-izoamylalkoholu (24:1) byly z lyzátu odstraněny bílkoviny a balastní látky. Vzorky byly centrifugovány na K 23 10 min při 6000 g a teplotě 4°C. Poté byly z horní čiré vodní fáze odebrány 2 vzorky po 0,5 ml. Pro vysrážení DNA byl přidán 1ml vychlazeného izopropanolu a vzorky byly zamrazeny při -20°C. Druhý den byly vzorky centrifugovány na MPW 310, a to 6 min při 11000 g a 4°C, sediment byl promyt 70% etanolem a opět centrifugován 6 min na MPW 310 při 11000 g. Po vylití supernatantu byly vzorky lyofilizovány a zamrazeny (-80°C).

4.3 PCR amplifikace 16S rRNA genu

Pro zjištění přítomnosti fytoplazmy byly vzorky podrobeny PCR amplifikaci. Vzhledem k malé koncentraci fytoplazmózní DNA a nutnosti vysoké citlivosti metody byla pro amplifikaci DNA zvolena metoda nested PCR, kdy je amplifikační produkt jedné reakce použit jako templát pro reakci následující. Nevýhodou tohoto postupu je vysoké riziko kontaminací a nespecifických reakcí. Podmínkou provedení je umístění nested PCR primerů uvnitř PCR produktu získaného reakcí direkt PCR.

4.3.1 Direct PCR

Pro první krok amplifikace 16S rDNA pomocí PCR reakce byla zvolena kombinace primerů P1/P7. Tyto primery amplifikují oblast 16S-23S rDNA a délka produktu je přibližně 1800bp.

Sekvence primerů P1/P7 (Deng a Hiruki, 1991, Schneider *et al.*, 1995)

P1 : 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'

P7 : 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'

Reakční směs PCR reakce byla připravená ve sterilním prostředí za pomoci sterilizovaných nástrojů za stálého chlazení na ledové tříšti. Do 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf byla připravena směs reakčního pufru, roztoku MgCl₂, sterilní neionizované vody, deoxyribonukleozidtrifosfátů (dNTPs), primerů a polymerázy. Objemy jednotlivých složek byly pipetovány dle Tabulky 3 v závislosti na počtu vzorků. Premix byl dále rozpipetován do 0,2 ml PCR mikrozkušavek vždy po 17 µl. Do těchto zkumavek byly přidány 3 µl vzorku. Takto připravené vzorky byly promíchány, stočeny na minicentrifuze a vloženy do termocycleru. Zde pak proběhla PCR amplifikace za podmínek definovaných v Tabulce 4.

Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití primerů P1/P7

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test
Flexi pufr	5 x	1 x	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
Voda			6,8 µl
dNTP	1 mM	200 µM	4 µl
Primer P1	20 pmol/µl	0,4 µM	0,4 µl
Primer P7	20 pmol/µl	0,4 µM	0,4 µl
Go Taq polymeráza	5 U/µl	1 U/reakce	0,2 µl
Objem reakční směsi		17 µl	
Objem vzorku		3 µl	
Objem reakce		20 µl	

Tab. 4: Podmínky PCR reakce za použití primerů P1/P7

95 °C, 3 min	
95 °C, 1 min	
55 °C, 1 min	35 cyklů
72 °C, 3 min	
72 °C, 10 min	

4.3.2 Nested PCR

Pro druhý krok amplifikace 16S rRNA pomocí PCR reakce byla zvolena kombinace primerů F1/B6 amplifikující oblast 16S rDNA v délce cca 1650bp a pro třetí krok kombinace primerů fU5/rU3 amplifikující oblast 16S rDNA v délce cca 850bp.

Složení reakční směsi nested PCR za použití primerů F1/B6 ukazuje Tabulka 5, podmínky reakce Tabulka 6. Jako vzorek byl použit neředěný produkt direct PCR s primery P1/P7.

Složení reakční směsi druhé nested PCR za použití primerů fU5/rU3 ukazuje Tabulka 7, podmínky reakce Tabulka 8. Jako vzorek byl použit neředěný produkt nested PCR s primery F1/B6.

Sekvence primerů F1/B6 (Davis a Lee, 1993, Padovan *et al.*, 1995)

F1 : 5'-AAGACGAGGATAACAGTTGG-3'

B6 : 5'-TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG-3'

Sekvence primerů fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995)

fU5 : 5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3'

rU3 : 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití primerů F1/B6

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test
Flexi pufr	5 x	1 x	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
Voda			7,05 µl
dNTP	1 mM	200 µM	4 µl
Primer F1	20 pmol/µl	0,25 µM	0,25 µl
Primer B6	20 pmol/µl	0,25 µM	0,25 µl
Go Taq polymeráza	5 U/µl	1,25 U/reakce	0,25 µl
Objem reakční směsi		17 µl	
Objem vzorku		3 µl	
Objem reakce		20 µl	

Tab. 6: Podmínky PCR reakce za použití primerů F1/B6

94 °C, 3 min
94 °C, 1 min
50 °C, 2 min 35 cyklů
72 °C, 3 min
72 °C, 10 min

Tab. 7: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití primerů fU5/rU3

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test
Flexi pufr	5 x	1 x	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
Voda			6,8 µl
dNTP	1 mM	200 µM	4 µl
Primer fU5	20 pmol/µl	0,4 µM	0,4 µl
Primer rU3	20 pmol/µl	0,4 µM	0,4 µl
Go Taq polymeráza	5 U/µl	1 U/reakce	0,2 µl
Objem reakční směsi		17 µl	
Objem vzorku		3 µl	
Objem reakce		20 µl	

Tab. 8: Podmínky PCR reakce za použití primerů fU5/rU3

95 °C, 2 min
95 °C, 1 min
55 °C, 1 min 35 cyklů
72 °C, 1 min
72 °C, 10 min

4.3.3 Gelová elektroforéza

Pro vyhodnocení polymerásové řetězové reakce byla využita elektroforéza na 1% agarosovém gelu. Ten byl připraven rozvařením 2 g agarosy ve 200 ml pracovního

roztoku TAE pufru 1x. K rychlému rozvaření byla použita mikrovlnná trouba.

Ze zásobního roztoku rozehrátého agarosového gelu bylo odebráno asi 45 ml. Po vychladnutí asi na 60°C bylo do gelu nepipetováno 2,5 µl fluorescenčního barviva GoldWiew (SBS, Beijing, China). Po důkladném promíchání barviva byl gel nalit do elektroforetické vaničky s hřebenem a pro důkladné ztuhnutí gelu byla vanička vložena na 30 minut do chladničky.

Ztuhlý gel byl v elektroforetické vaně po rysku přelit TAE pufrům 1x a poté byl odstraněn hřeben, čímž vznikla řada jamek. Do první jamky byl nanesen standard molekulové váhy DNA hyper ladder II (Bioline, Germany) v množství 2 µl. Do ostatních jamek byly nanесeny jednotlivé vzorky v množství 5 µl. Elektroforéza byla připojena ke zdroji stejnosměrného proudu o napětí 90V a přibližně po 30 minutách byla vyhodnocena pomocí UV transluminátoru.

4.3.4 Izolace DNA z gelu

Pro další práci bylo nutné izolovat DNA z gelu. Podle výsledku PCR reakce a podle síly bandů byly vybrané pozitivní vzorky podrobeny elektroforéze v 1% agarosovém gelu s přidavkem ethidium bromidu a dále byla DNA z gelu extrahována pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit. Postup práce odpovídal protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Sterilním skalpelem byly z 1% agarosového gelu pod UV transluminátorem vyříznuty bloky obsahující separovanou DNA z PCR produktů. Tyto bloky byly vloženy do předem zvážených mikrozkušavek typu eppendorf a byla zjištěna jejich hmotnost. Jako výchozí hodnota byla poté stanoven objem nejtěžšího bloku (100 mg = 100 µl).

K jednotlivým vzorkům byl přidán QG pufr v trojnásobném množství v porovnání s výchozí hodnotou. Pro rozpuštění gelu v pufru byly vzorky inkubovány 10 min při 50°C a protřepány. Po kontrole zbarvení roztoku byl přilít izopropanol v množství odpovídající výchozí hodnotě. Dále byly vzorky přelity do separačních kolonek se sběrnou zkumavkou a centrifugovány na Biofuge pico 1min při 10 000 g. Po odstranění protečené části bylo ke vzorku na kolonku přidáno 0,5 ml QG pufru a kolonky opět centrifugovány 1 min při 10 000 g. Proteklá část byla odstraněna a do kolonky přilito 0,75 ml PE pufru s ethanolem. Následovala centrifugace 1 min při 10 000 g, vylití proteklé části a opět centrifugace 1 min při 10 000 g pro dokonalé

vysušení. Kolonky byly přemístěny do čistých popsaných mikrozkušavek. Pro uvolnění DNA z kolonky bylo na membránu kolonky nanášeno 50 μ l sterilní deionizované vody a následovala centrifugace 1 min při 10 000 g.

Takto připravené vzorky izolované DNA byly lyofilizovány pomocí SPD SpeedVac a zamraženy v -20°C . Vzorky byly dále použity pro transformaci bakterií *E.coli*.

4.4 Transformace bakterií *E.coli*

4.4.1 Ligace DNA do plazmidu

DNA pozitivních vzorků izolovaná z agarosového gelu byla pro další práci ligovaná do pGem-T plazmidu pomocí kitu (pGEM-T Vector System, Promega, USA) podle modifikovaného návodu výrobce.

Ligační směs byla připravena smícháním 5 μ l pGEM-T ligačního pufu, 1 μ l T4 DNA ligázy, 0,5 μ l pGEM-T plazmidu a 3,5 μ l PCR produktu. Z důvodu vyšší účinnosti probíhala ligace přes noc při 4°C .

4.4.2 Transformace bakterií *E.coli*

Pro namnožení plazmidu s vloženým PCR produktem byla využita metoda transformace kompetentních buněk *E.coli* kmene JM 109. Proces transformace proběhl teplotním šokem.

Kompetentní buňky JM 109 byly na ledu rozmrazeny a rozděleny do 1,5ml mikrozkušavek po 50 μ l. Toto množství kompetentních buněk bylo smícháno s 5 μ l ligační směsí a z důvodu stabilizace směsi byly buňky inkubovány 20 min na ledu. Transformace pomocí teplotního šoku proběhla inkubací v DryBlocku při teplotě 42°C po dobu 45 sekund a ihned poté byly buňky přemístěny alespoň na 2 min na led. K takto transformovaným buňkám bylo přidáno 850 μ l PSI broth media a směs byla inkubována 1,5 hod při teplotě 37°C . V tomto kroku dochází k obnově buněčné stěny, aktivaci fyziologických procesů buňky a aktivaci exprese genů. Po inkubaci byla suspenze kultury transformovaných bakteriálních buněk zkoncentrována centrifugací na Biofuge pico po dobu 2 min při 5000 g. Z mikrozkušavky bylo opatrně odstraněno cca 850 μ l supernatantu a ve zbytku media byl sediment buněk resuspendován. Resuspendované

buňky byly přeneseny na povrch tuhého LB media s přidavkem ampicilinu do konečné koncentrace 100 µg/1ml média. Na povrch média bylo nejprve sterilní kličkou rozetřeno 40 µl X-Gal a 4 µl IPTG. Petriho misky s kulturou transformovaných buněk byly inkubovány přes noc při 37°C obrácené dnem vzhůru. Následující den byly vyhodnoceny narostlé kolonie. Pozitivní bílé kolonie byly přinokulovány pomocí sterilních párátěk na nové LB/Amp médium, kde byly jednotlivé kolonie rozetřeny do malé plošky. Zároveň bylo párátko s bakteriemi omočeno v PCR reakční směsi pro ověření pozitivních kolonií.

4.4.3 Test kolonií pomocí colony PCR reakce

Ověření úspěšnosti ligace a transformace bakterií bylo provedeno pomocí colony PCR reakce za použití primerů M13f a M13r se specifickými podmínkami reakce (viz Tab 9). Jako vzorek byly do jednotlivých PCR mikrozkušavek s 25 µl reakční směsi (viz Tab. 10) sterilním párátkem přeneseny jednotlivé kolonie transformovaných bakterií nesoucí ligovaný plazmid. Výsledek colony PCR reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu.

Sekvence primerů M13f/M13r (Invitrogen, 1999)

M13f : 5'-GTAAAACGACGGCCA G-3'

M13r : 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tab. 9: Podmínky PCR reakce za použití primerů M13f/M13r

94 °C, 5 min
94 °C, 1 min
55 °C, 2 min 35 cyklů
72 °C, 3 min
72 °C, 10 min

Tab. 10: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití primerů M13f/M13r

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test
Pufř	10x	1 x	2,5 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75 µl
Voda			19,8 µl
dNTP	2 mM	100 µM	1,25 µl
Primer M13f	20 pmol/µl	0,2 µM	0,25 µl
Primer M13r	20 pmol/µl	0,2 µM	0,25 µl
Taq polymeráza	5 U/µl	1 U/reakce	0,2 µl
Objem reakční směsi		25 µl	
Objem vzorku		0 µl	

4.4.4 Příprava bakteriální konzervy

Pro další manipulace a analýzy, především pak pro izolaci plazmidů, byly z pozitivních kolonií připraveny bakteriální konzervy.

Do 1,5ml mikrozkušavek byl pipetován 1ml tekutého LB/Amp média a sterilním párátkem byly do média přeneseny transformované bakteriální kolonie nesoucí ligovalý plazmid. Tyto se pak inkubovaly při 37°C za stálého míchání na třepačce přes noc. Druhý den se smíchalo 0,85 ml noční suspenze transformovaných bakterií s 0,15 ml sterilního glycerolu a zkumavky byly důkladně promíchány. Takto vzniklé bakteriální konzervy byly zamrazeny v hluboko mrazícím boxu při -80°C, kde je možno bakterie uchovat až několik let.

4.5 Sekvencování

Příprava vzorků pro sekvenaci byla provedena pomocí BIG DYE sequencing terminator kit ver. 3.1 (PE Biosystems, Warrington, UK) pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů na katedře Buněčné biologie a genetiky. Sekvence genů vzorků vložených do plazmidu byla zjištěna za použití automatického sekvenátoru ABI PRISM model 3730 (PE Applied Biosystems, USA) na Ústavu experimentální botaniky ČR v Olomouci. Složení částečných sekvencí bylo provedeno pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů na katedře Buněčné biologie a genetiky.

4.6 Příprava pracovních roztoků

Doyle-Doyle pufr

2,5%	CTAB	12,5 g
1,4 M	NaCl	40,9 g
20 mM	Na ₂ EDTA	3,72 g
100 mM	Tris-HCl	6,06 g Tris
1%	PVP	5 g

Přidat demineralizovanou vodu do celkového objemu roztoku 500 ml a pH upravit na 8,0 pomocí konc. HCl.

Delaporta pufr

Zásobní roztok 2x:	16,5 g	K ₂ HPO ₄
	4,1 g	KH ₂ PO ₄
	100 g	sacharóza
	1,5 g	BSA
	20 g	PVP 10 (MW cca 10 000)

Přidat demineralizovanou vodu do celkového objemu roztoku 500 ml a pH upravit na 7,6.

TAE pufr

TAE pufr 1x :	40 mM	TRIS–acetát
	2 mM	EDTA

50x zásobní roztok:	242 g	TRIS base
	57,1 ml	ledová kyselina octová
	37,2 g	Na ₂ EDTA . 2H ₂ O

doplnit H₂O do 1000 ml a upravit pH na 8,5.

X-gal (Fermentas)

rozpusťit X-Gal v dimethylformamidu do koncentrace 20mg/ml

IPTG (Fermentas)

2g IPTG v rozpusťit v 8 vody, doplnit vodou do 10 ml, sterilizovat přes filtr

Celková koncentrace: 200mg/ml

LB médium

Pro 250ml média: 2,5 g kasein hydrolyzát
 1,25 g kvasničný autolyzát
 1,25 g pepton
 2,5 g NaCl
 250 ml voda
 4,25 g agar

4.7 Přístrojové vybavení laboratoře

flowbox TESLA 002FT/A

flowbox Telstar PV-100

vortex IKA MS1 Minishaker

minicentrifuga Spectrafuge mini

minicentrifuga Wealtec E-cevtrifuge

PCR cycler Biometra T-Personal

centrifuga MLW K 23 D

centrifuga Jouan MR 22i

centrifuga Biofuge pico

teplotní lázeň Bioem mixing block MB 102

teplotní lázeň Labnet digital dry bath

Thermo Savant SPD SpeedVac SPD111V

elektroforéza Biometra Power Pack P25

váhy AaD EK-200G

inkubátor Flow laboratories CO₂ incubator 1500

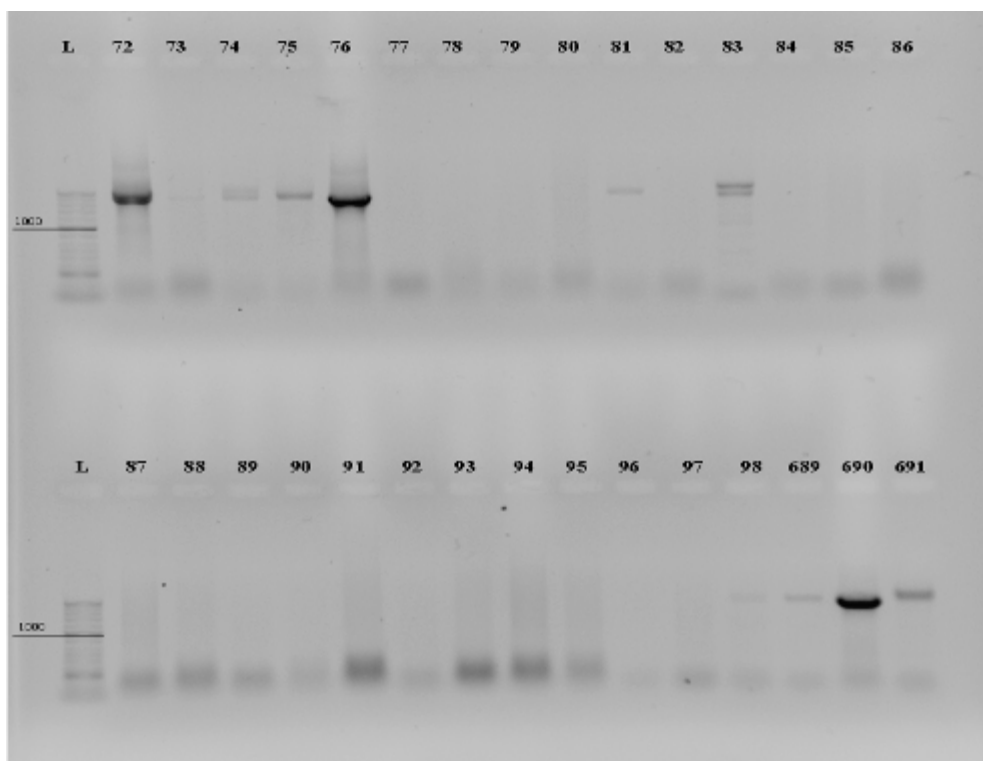
transluminátor Syngene G-box

hlubokomrazící box Sanyo MDF-U52V

5 Výsledky:

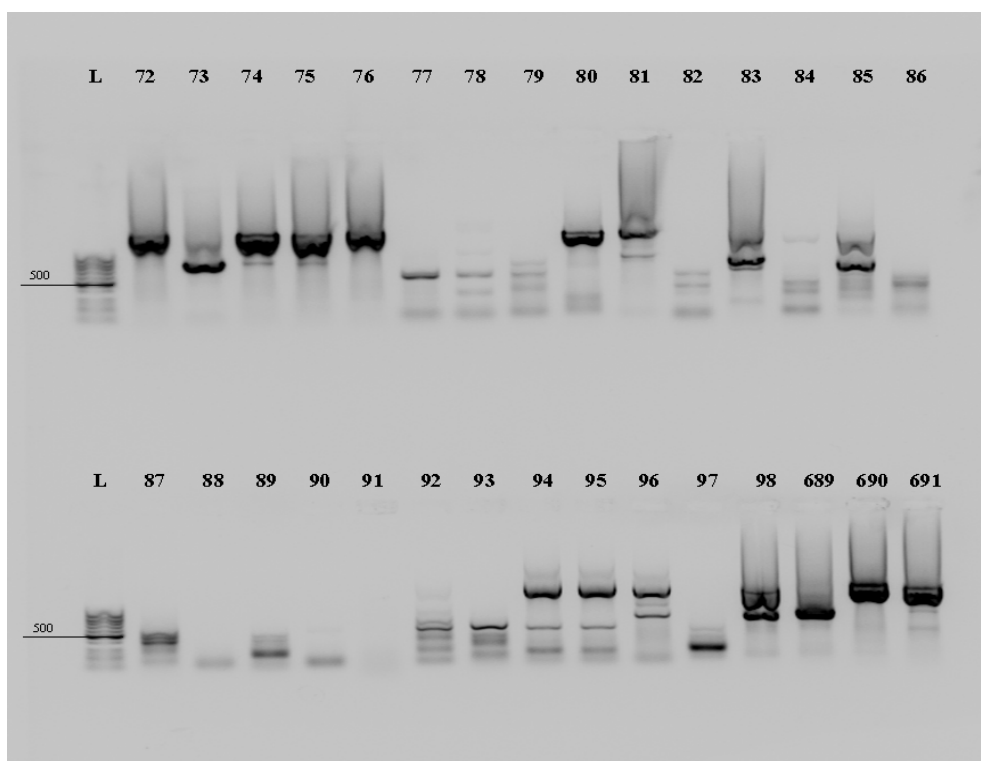
Experimentální část jsem začal izolací celkové DNA z vybraných vzorků plevelů. Pokračoval jsem provedením nested PCR reakce za použití primerů P1/P7 → F1/B6 → fU5/rU3. Při této velmi citlivé reakci došlo u pozitivních vzorků k amplifikaci fytoplazmózní DNA v úseku 16S rDNA. Výsledek reakce zvlášť vyhodnocen pro každý pár primerů pomocí elektroforetické separace v agarosovém gelu. Výsledky PCR reakce ukazují obrázky 1 až 3.

Obrázek 1: Elektroforéza produktů direct PCR za použití primerů P1/P7



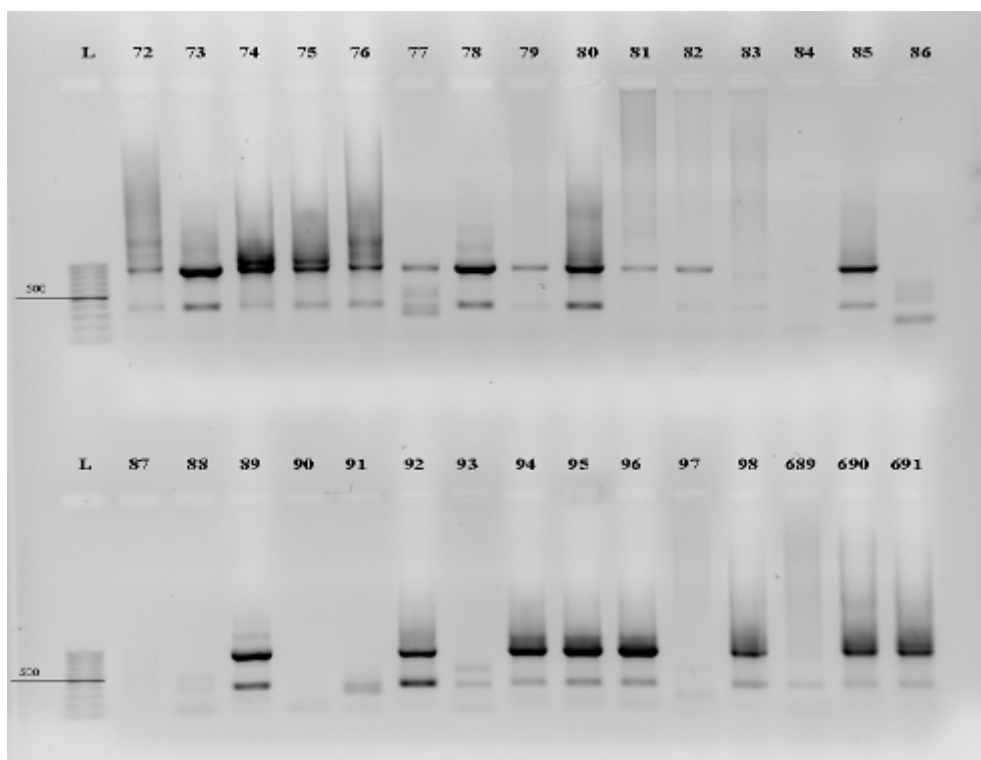
L – standard molekulové váhy, Vzorky jsou očíslovány podle seznamu vzorků (viz Tab. 2)

Obrázek 2: Elektroforéza produktů nested PCR za použití primerů P1/P7 → F1/B6



L – standard molekulové váhy, Vzorky jsou očíslovány podle seznamu vzorků (viz Tab. 2)

Obrázek 3: Elektroforéza produktů druhé nested PCR za použití primerů P1/P7 → F1/B6 → fU5/rU3



L – standard molekulové váhy, Vzorky jsou očíslovány podle seznamu vzorků (viz Tab. 2)

Pro další práci jsem vybral PCR pozitivní vzorky, tj. silný band odpovídající velikosti (Obr. 1 až 3, Tab. 11), a z agarosového gelu jsem izoloval amplifikovanou DNA. V případě silného dvojbandu je vzorek druhého bandu označen číslem s písmenem B. Amplikon jsem pak vložil do pGem-T plazmidu a tímto vektorem jsem transformoval bakterie *E. coli* za použití metody transformace teplotním šokem. Transformované bakterie jsem kultivoval a pomocí modro-bílé selekce vybral úspěšně transformované. Úspěšnost transformace jsem ověřil reakcí 'colony' PCR, kde se jako templát použije suspenze transformovaných bakterií, s vyhodnocením elektroforézou na agarosovém gelu (viz Obr. 4 až 10). U 'colony' PCR reakce jsem zvolil vyšší počet amplifikačních cyklů z důvodu možnosti využít amplifikovanou DNA pro sekvenaci.

Z úspěšně transformovaných kolonií byly založeny bakteriální konzervy. Pro sekvenování byly využity vzorky amplifikované DNA pomocí 'colony' PCR.

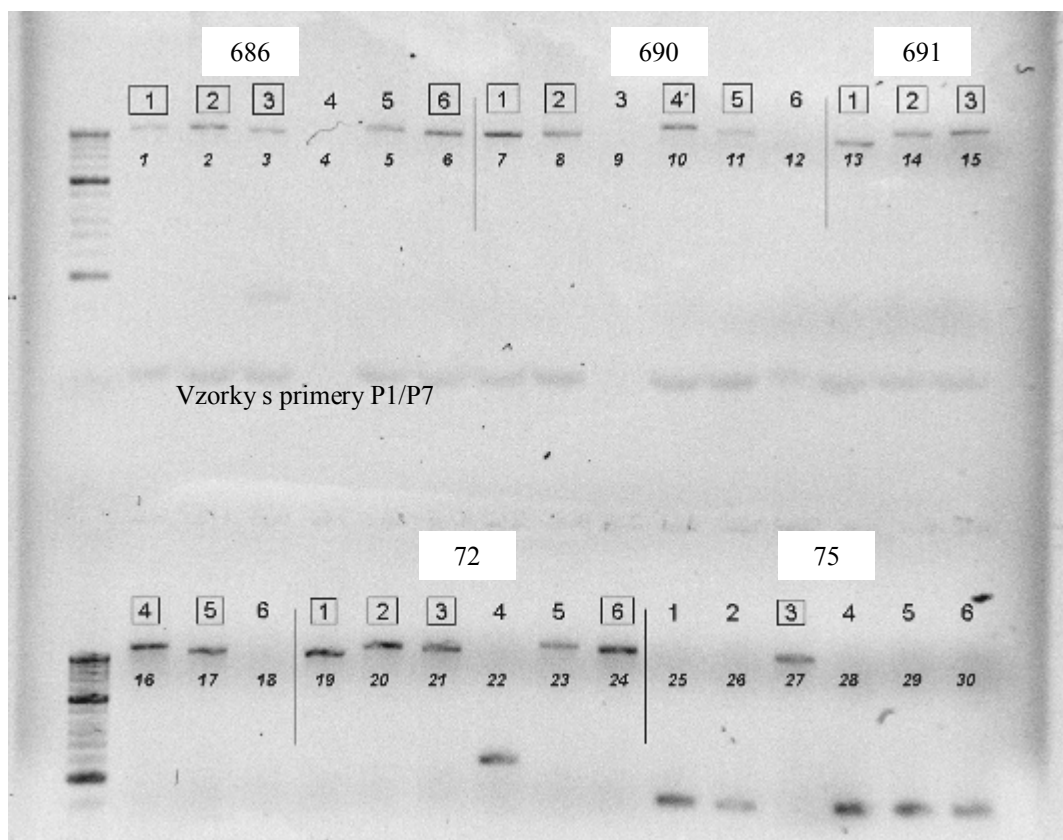
Tab. 11: Výsledky PCR amplifikace a výběr pro transformace

Číslo vzorku	P1/P7	F1/B6	fU5/rU3	Vybráno pro transformace
72	2	1	1	P1/P7
73	-	1	3	fU5/rU3
74	1	3	3	P1/P7
75	1	3	3	P1/P7
76	3	3	3	P1/P7
77	-	-	1	fU5/rU3
78	-	-	3	fU5/rU3
79	-	-	1	fU5/rU3
80	-	2	3	F1/B6
81	1	1	1	P1/P7
82	-	-	1	fU5/rU3
83	1 dva bandy	1 dva bandy	-	F1/B6 2 vzorky
84	-	-	-	---
85	-	1 dva bandy	3	F1/B6 2 vzorky
86	-	-	-	---
87	-	-	-	---
88	-	-	-	---
89	-	-	3	fU5/rU3
90	-	-	-	---
91	-	-	-	---
92	-	-	3	fU5/rU3
93	-	-	-	---
94	-	3	3	F1/B6
95	-	3	3	F1/B6
96	-	3 dva bandy	3	F1/B6 2 vzorky

Číslo vzorku	P1/P7	F1/B9	fU5/rU3	Vybráno pro transformace
97	-	-	-	---
98	-	1 dva bandy	2	F1/B6 2 vzorky
689	1	1	-	P1/P7
690	3	3	3	P1/P7
691	1	3	3	P1/P7

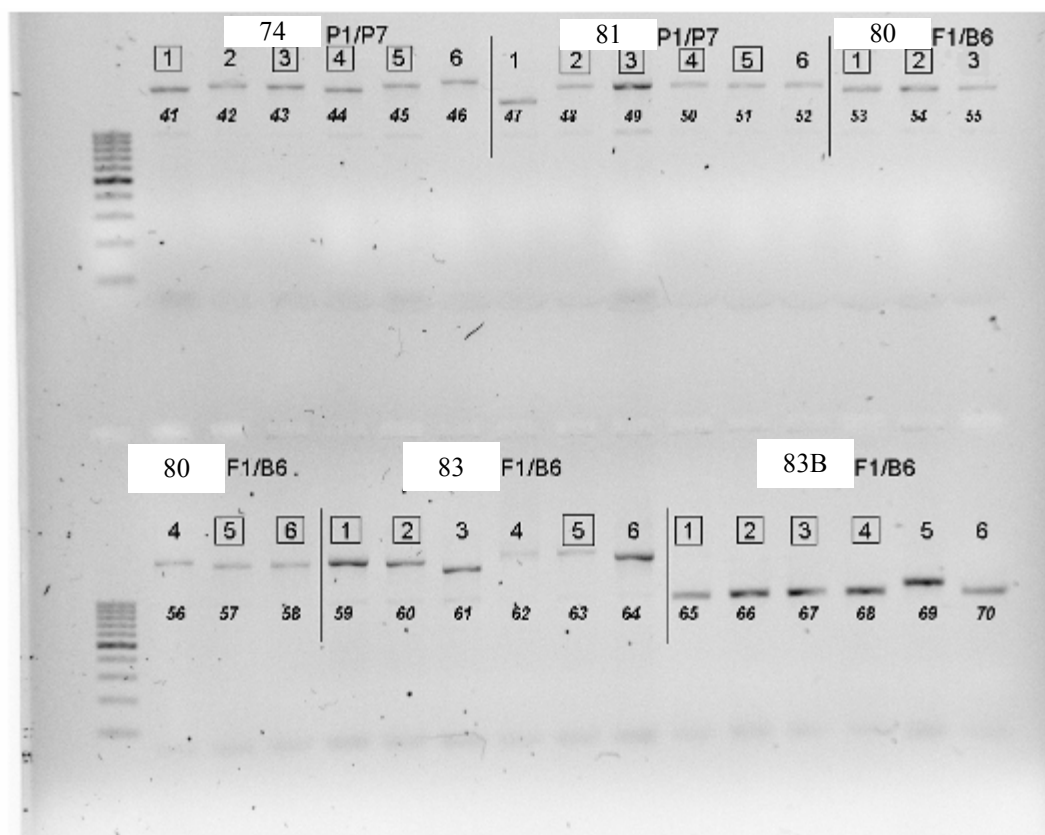
číslo 1 – slabý band, 2 – středně silný band, 3 – silný band, pomlčka – bez bandu, negativní výsledek PCR reakce

Obrázek 4: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



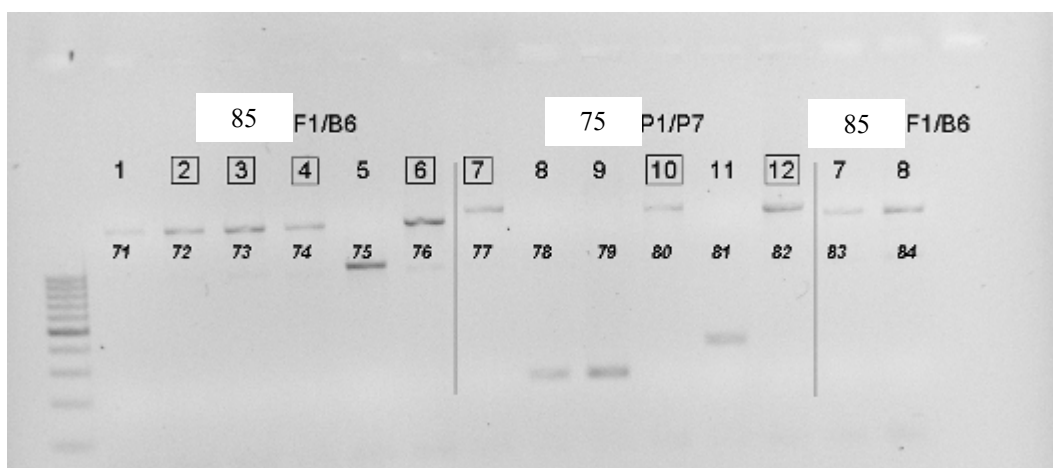
čísla psaná *kurzívou* – číslo mikrozkušky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 5: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



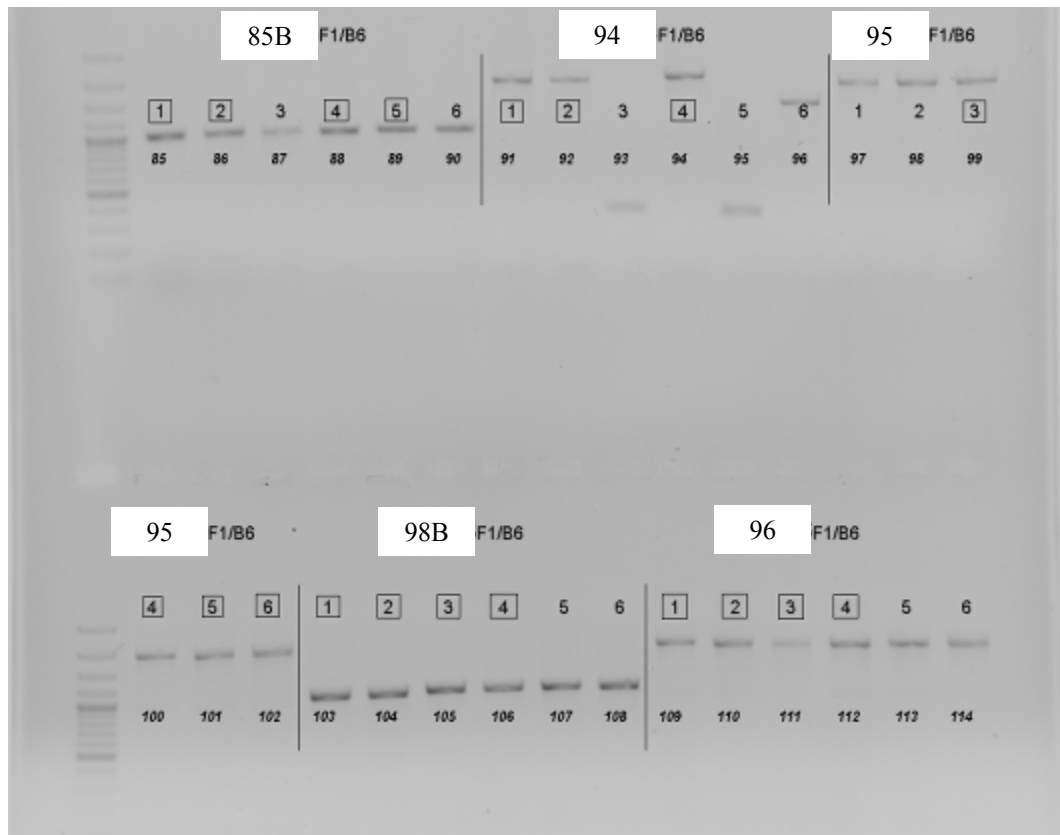
čísla psaná *kurzívou* – číslo mikroskopavky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 6: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



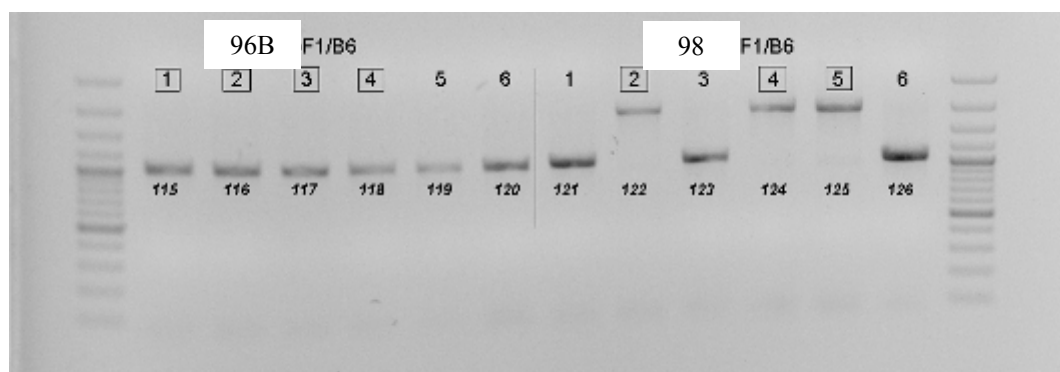
čísla psaná *kurzívou* – číslo mikroskopavky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 7: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



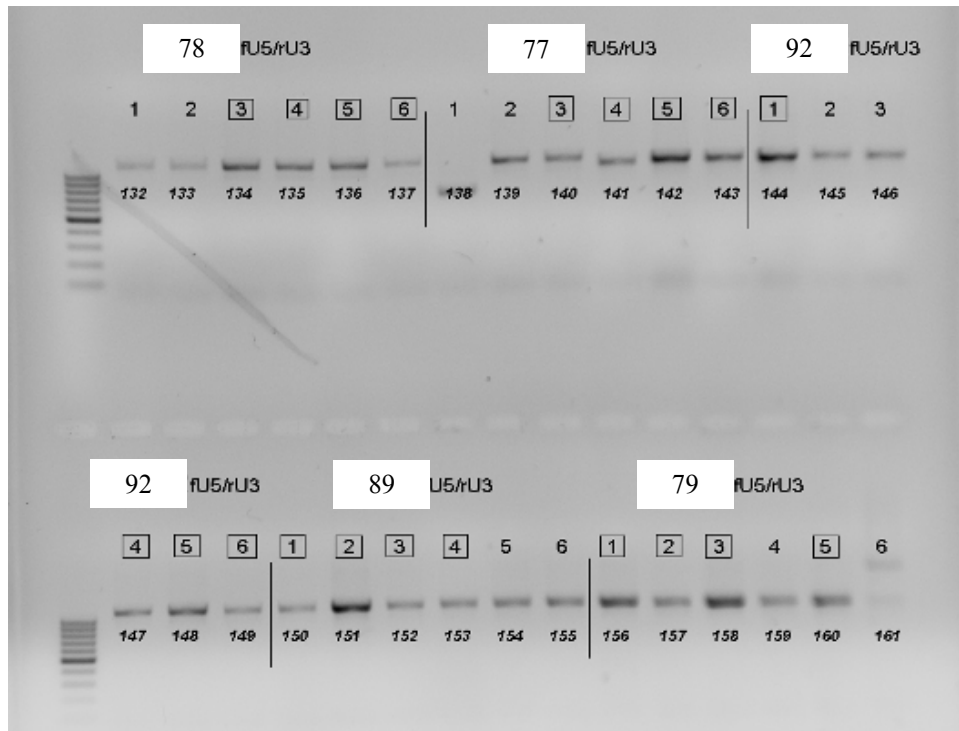
čísla psaná *kurzívou* – číslo mikroskopavky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 8: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



čísla psaná *kurzívou* – číslo mikroskopavky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 9: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



čísla psaná *kurzívou* – číslo mikrozkušky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Obrázek 10: Elektroforéza produktů PCR testu transformovaných kolonií s označením vzorků vybraných pro založení bakteriálních konzerv



čísla psaná *kurzívou* – číslo mikrozkušky, číslo ve čtverci – kolonie vybraná pro tvorbu bakteriální konzervy, čtyřmístné číslo – číslo vzorku podle knihy izolací

Porovnání sekvencí BLAST

Sekvence získané sekvencováním produktů reakce 'colony' PCR jsem porovnal v programu BLAST s již existujícími sekvencemi v databázi GenBank.

Ze dvanácti vzorků izolovaných z pcháče (*Cirsium arvense*) byly fytoplazmy detekovány u šesti vzorků. Vzorek 77 byl určen jako fytoplazma skupiny Elms yellows group 16SrV. Vzorky 78, 94, 95 a 96 byly na základě srovnání s nejvíce příbuznými sekvencemi zařazeny do skupiny X-disease group 16SrIII. Vzorek 690 byl určen jako zástupce rodu fytoplazma, ale vzhledem k neúplnosti údajů u nejvíce příbuzných sekvencí nebo nízké identity s dalšími sekvencemi nebyla vyhodnocena skupina. U vzorků 689, 691, 86, 88, 90 a 91 nebyly získány sekvence.

Z patnácti vzorků izolovaných ze svlačce (*Convolvulus arvensis*) byly fytoplazmy detekovány u devíti vzorků. Vzorek 98 byl určen jako fytoplazma skupiny X-disease group 16SrIII. Vzorky 79 a 82 byly zařazeny mezi fytoplazmy skupiny Elms yellows group 16SrV. Vzorky 73, 76, 80, 85, 89 a 92 patří podle porovnání s příbuznými sekvencemi do skupiny Stolbur group 15SrXII. U vzorků 75, 81, 83, 83B a 85B byly podle srovnání sekvencí detekovány jiné organismy, obvykle nekultivovatelné bakterie (viz Tab. 13 až 15). U vzorků 72, 74 a 87 nebyly získány sekvence.

Ve vzorcích lebedy lesklé (*Atriplex sagittata*), kokošky pastuší tobolky (*Capsella bursa-pastoris*) a bramboru (*Solanum tuberosum*) nebyly fytoplazmy detekovány. Hodnocení podobnosti sekvencí analyzovaných vzorků je shrnuto v Tabulkách 13, 14 a 15.

Tab. 13: Hodnocení podobností získaných sekvencí analyzovaných vzorků (primery fU5/rU3)

Vzorek /kolonie	Accession number	Maximální skóre	Identita	Popis
73/1, 3	FJ409624.1	1609	99%	Iranian plum phytoplasma PJ15 I 16SrXII
	GU797558.1	1602	99%	Iranian tomato big bus phytoplasma strain TBB17
	FJ685752.1	1602	99%	Apple stolbur phytoplasma 16SrXII
	FJ409899.1	1602	99%	Phytoplasma sp. BN-Ma202 16SrXII
				Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII

Vzorek /kolonie	Accession number	Maximální skóre	Identita	Popis
73/5	FJ551414.1			Uncultured Rubrobacteriales bacterium
	EF998993.1			Uncultured Actinobacterium
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				
77/3, 5	EU184021.1	1600	99%	Ca. Phytoplasma ulmi strain EYCZ1 16SrV
	FN562932.1	1594	99%	Ca. Phytoplasma vitis 16SrV
77/3, 5	FJ611961.1	1594	99%	Ca. Phytoplasma vitis strain Portugal1 16SrV
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrV				
78	FJ207454.1	1596	99%	Schinus molle phytoplasma 16SrIII
	EU168791.1	1591	99%	'Euscelidius variegatus' phytoplasma
	EF031544.1	1591	99%	Cranberry False Blossom phytoplasma
	AY049029.1	1591	99%	Gaillardia phyllody phytoplasma 16SrIII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrIII				
82	EU184021.1	1605	99%	Ca. Phytoplasma ulmi strain EYCZ1 16SrV
	FN562932.1	1600	99%	Ca. Phytoplasma vitis 16SrV
	FJ611961.1	1600	99%	Ca. Phytoplasma vitis strain Portugal1 16SrV
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrV				
89	FJ409624.1	1618	99%	Iranian plum phytoplasma PJ15 I 16SrXII
	GU797558.1	1611	99%	Iranian tomato big bus phytoplasma strain TBB17
	FJ685752.1	1611	99%	Apple stolbur phytoplasma 16SrXII
	FJ409899.1	1611	99%	Phytoplasma sp. BN-Ma202 16SrXII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII				
79	EU184021.1	1615	99%	Ca. Phytoplasma ulmi strain EYCZ1 16SrV
	FN562932.1	1609	99%	Ca. Phytoplasma vitis 16SrV
	FJ611961.1	1609	99%	Ca. Phytoplasma vitis strain Portugal1 16SrV
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrV				
92	Y16391.1	1611	99%	Bindweed yellows phytoplasma
	DQ464999.1	1555	98%	Ca. Phytoplasma solani 16SrXII
	FJ943262	1539	98%	Ca. Phytoplasma australiense NZ09156 16SrXII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII				

Tab. 14: Hodnocení podobností získaných sekvencí analyzovaných vzorků (primery F1/B6)

Vzorek /kolonie	Accession number	Maximální skóre	Identita	Popis
80	EU344887.1	3024	99%	Russia potato purple top ph. Rus-PPT100 16SrXII
	EU344886.1	3024	99%	Russia potato purple top ph. Rus-PPT97 16SrXII
	EU010006.1	3013	99%	Ca. Phytoplasma solani isolate 391_05 16SrXII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII				
83	CP001977.1	2126	89%	Propionibacterium acnes SK137
	AE017283.1	2126	89%	Propionibacterium acnes KPA 171202
	AY354921.1	2108	89%	Propionibacterium sp. LG
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				
83B	EU219972.1	854	96%	Paenibacillus sp. KMC003
	AY257871.1	852	97%	Paenibacillus sp. MB2039
	AF353690.1	841	96%	Paenibacillus naphthalenovorans
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				
85	EU344887.1	3022	99%	Russia potato purple top ph. Rus-PPT100 16SrXII
	EU344886.1	3022	99%	Russia potato purple top ph. Rus-PPT97 16SrXII
	EU010006.1	3016	99%	Ca. Phytoplasma solani isolate 391_05 16SrXII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII				
94	AY049029.1	3064	99%	Gaillardia phyllody phytoplasma 16SrIII
	AF173558.1	3064	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
	AF175304.1	3051	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrIII				
85B/ 62	EF998993.1	865	99%	Uncultured Actinobacterium clone G81
	EU083731.1	857	98%	Uncultured bacterium clone N08
85B/ 61	FJ551414.1	931	89%	Uncultured Rubrobacterales bacterium
	GQ396927.1	826	97%	Uncultured bacterium clone AK4AB2 03H
85B/ 63	FJ551414.1	909	89%	Uncultured Rubrobacterales bacterium
	EF998993.1	852	99%	Uncultured Actinobacterium clone G81
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				

Vzorek	Accession number	Maximální skóre	Identita	Popis
95	AY049029.1	3051	99%	Gaillardia phyllody phytoplasma 16SrIII
	AF173558.1	3051	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
	AF175304.1	3038	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrIII				
96	AY049029.1	3044	99%	Gaillardia phyllody phytoplasma 16SrIII
	AF173558.1	3044	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
	AF175304.1	3031	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrIII				
96B	EU219972.1	854	96%	Paenibacillus sp. KMC003
	AY257871.1	852	97%	Paenibacillus sp. MB2039
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				
98	AY049029.1	3048	99%	Gaillardia phyllody phytoplasma 16SrIII
	AF173558.1	3048	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
	AF175304.1	3035	99%	Clover yellow edge phytoplasma 16SrIII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrIII				

Tab. 15: Hodnocení podobností získaných sekvencí analyzovaných vzorků (primery P1/P7)

Vzorek	Accession number	Maximální skóre	Identita	Popis
690	X83438.1	3179	99%	Mollicutes sp. 16S rRNA gene and tRNA-Ile
	Y15865.1	2830	95%	Phytoplasma sp. 16S rRNA, tRNA-Ile genes
	AF248961.1	2808	94%	BGWL phytoplasma 16S ribosomal RNA gene
Závěr: fytoplazma nezařazená podle srovnání sekvence				
75	DQ448721.1	2006	90%	Marmoricola sp. CNJ872 PL04 16S rRNA gene
	AB374375.1	1965	89%	Uncultured endolithic bacterium gene for 16S rRNA
	DQ448720.1	1964	90%	Marmoricola sp. CNJ780 PL04 16S rRNA gene
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				

Vzorek	Accesion number	Maximální skóre	Identita	Popis
76	AF248959.1	3179	98%	Stolbur phytoplasma 16S rRNA gene 16SrXII
	EU086529.1	3171	98%	Candidatus Phytoplasma solani 16SrXII
	EU344887.1	3129	98%	Russia potato purple top phytoplasma 16SrXII
Závěr: fytoplazma skupiny 16SrXII				
81	CP001977.1	3085	98%	Propionibacterium acnes SK137
	AE017283.1	3085	98%	Propionibacterium acnes KPA171202
Závěr: nejedná se o fytoplazmu				

6 Diskuze

V této práci jsem detekoval a identifikoval fytoplazmy vyskytující se na plevelných rostlinách pcháči (*Cirsium arvense*) a svlačci (*Convolvulus arvensis*) metodou sekvenční analýzy DNA získané nested PCR amplifikací úseku 16SrDNA při zvolené kombinaci primerů P1/P7 → F1/B6 → fU5/rU3.

Úspěšnost detekce a identifikace fytoplazem zvolenou metodou byla uspokojivá, lze tedy potvrdit vhodnost metody nested PCR s uvedenou kombinací primerů, jak doporučuje Fránová *et al.* (2007). Taktéž nutno upozornit na četné nespecifické reakce a to zejména u páru primerů P1/P7. Následkem těchto nespecifických reakcí se v některých vzorcích objevily sekvence 16SrRNA genu propionových bakterií, bakterií příbuzných rodu *Actinobacterium* nebo bakterií skupiny *Rubrobacteriales*. Tyto bakterie se mohly do vzorků dostat kontaminacemi, například z kůže pracovníka laboratoře. Nespecifitu reakcí a možnost detekce jiného organismu popisují v literatuře i jiní autoři (Skrzeczkowski *et al.*, 2001; Navrátil *et al.*, 2005; 2007)

Na pcháči (*Cirsium arvense*) byly v největší míře nacházeny fytoplazmy zařazené do skupiny X-disease group 16SrIII. Této skupině odpovídaly čtyři vzorky ze šesti obsahujících sekvenční fytoplazem. Výskyt fytoplazem této skupiny na pcháči koreluje s údaji uváděnými v dostupné literatuře (Rančič *et al.*, 2005). Nově byla u vzorku č. 3777 nalezena sekvence 16SrRNA genu fytoplazmy zařazené do skupiny Elms yellows grou 16SrV. S touto skupinou fytoplazem jsem se v souvislosti s pcháčem v literatuře nesešel. Podle předběžné analýzy byla na vzorku č. 2682 (Navrátil ústní sdělení) detekována fytoplazma skupiny Rice yellow dwarf 16SrXI. Výskyt fytoplazem této skupiny nebyl u mého souboru vzorků zaznamenán. Fytoplazmy skupiny Aster yellows 16SrI (Jomantiene *et al.*, 1999 nepublikováno) a skupiny Bermuda grass white leaf 16SrXIV (Marcone *et al.*, 2004), jejichž výskyt byl na pcháči zaznamenán, rovněž nebyly v testovaném souboru vzorků detekovány.

V souborů vzorků izolovaných ze svlačce (*Convolvulus arvensis*) byly u šesti vzorků z devíti na fytoplazmy pozitivních detekovány podle očekávání fytoplazmy skupiny Stolbur group 15SrXII. Překvapením byl opět výskyt fytoplazmy skupiny Elms yellows grou 16SrV ve vzorcích č. 3779 a 3782 a výskyt fytoplazmy skupiny X-disease group 16SrIII u vzorku č. 3798.

7 Závěr

V rámci bakalářské práce jsem podle dostupné literatury vypracoval literární rešerši na téma výskyt a molekulární charakteristika fytoplazem vyskytujících se na pcháči (*Cirsium arvense*).

V experimentální části jsem detekoval fytoplazmy na různých druzích plevelů pomocí metody nested PCR za použití kombinace primerů P1/P7 → F1/B6 → fU5/rU3, která se potvrdila jako velmi citlivá a dostupná metoda detekce fytoplazem, nicméně v případě primerů P1/P7 byly nespecificky detekovány také jiné druhy bakterií.

Ve vzorcích izolovaných z pcháče (*Cirsium arvense*) jsem detekoval fytoplazmy skupiny 16SrIII a 16SrV. Ve vzorcích izolovaných ze svlače (*Convolvulus arvensis*) jsem detekoval fytoplazmy skupiny 16SrIII, 16SrV a 16SrXII.

8 Seznam použité literatury

- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.
- Bertaccini A. (2007), *Phytoplasma: diversity, taxonomy, and epidemiology*, *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689, January 1, 2007.
- Davis R.E., Lee I.-M., (1993) Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 1008-1011.
- Deng S., Hiruki C., (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 56-61.
- Dostál Josef, *Nová květena ČSSR 2*, Academia, Praha, 1989.
- Fránová J., Petrzik K., Paprštejn F., Kučerová J., Navrátil M., Válová P., Nebesářová J., Jakešová H., (2007): Experiences with phytoplasma detection and identification by different methods. *Bulletin of Insectology* 60, 247-248.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification. *Journal of Bacteriology* 176, 5244-5254.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1175-84.
- Jomantiene, R., Staniulis, J., Antoniuk, L. and Davis, R.E. (1999) New phytoplasma associated with *Cirsium* yellows disease contains the same 16S rDNA sequence as *rrnA* of clover phyllody phytoplasma. Unpublished.
- Jones P., Devonshire B.J., Holman T.J., Ajanga S., (2004) First report of a 16SrXI Group phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma oryzae*) associated with Napier grass stunt disease in Uganda. *Plant pathology* 53, 4, 519.
- Jung H., Sawayanagi T., Wongkaew P., Kakizawa S., Nishigawa H., Wei W., Oshima K., Miyata S., Ugaki M., Hibi T., Namba S., (2003) *Candidatus phytoplasma oryzae*, a novel taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1925-1929.
- Khan J. A., Srivastava P., Singh S. K. (2004) Efficacy of nested-PCR for the detection of phytoplasma causing spike disease of sandal. *Current science* VOL. 86, NO. 11, 10 JUNE 2004.
- Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A., Reinhard R., Seemüller E., The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*' *BMC Genomics* 2008, 9:306.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bottner K. D., Marcone C., Seemüller E., (2004) '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 1037-1048.
- Lee I.M., Martini M., Marcone C, Zhu S.F., Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 337-347.
- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E., (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.

- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups. *Phytopathology* 89, 805-810.
- Marcone C., Schneider B., Seemüller E., (2004) 'Candidatus Phytoplasma cynodontis', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1077–1082.
- Navrátil, M., Fialová, R. (Eds.): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost a Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 156.
- Navrátil M., Příbylová J., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Špak J., Kubelková D., Petrzik K., Karešová R., Špaková V. (2007). Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*. *Bulletin of Insectology* 60, 123-124.
- Navrátil M., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Duchoslav M., Petrzik K. (2005). Detectability of European stone fruit yellows phytoplasma using PCR with ribosomal primers. *Phytopathologica Polonica* 35, 117-120.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H. Y., Wei W., Suzuki S, Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S., (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature genetics* 36, 27-29.
- Padovan A.C., Gibb K.S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R.E., Magarey P.A., Sears B.B., (1995): Molecular detection of Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 25-31.
- Rančić D., Paltrinieri S., Toševski I., Petanovic R., Srevanović B., Bertaccini A., (2005) First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology* 54, 561.
- Razin, S. (1992). *Mycoplasma taxonomy and ecology*, p. 3-22. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Seemüller, E., Schneider, B. (2004): 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1217–1226.
- Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B., Seemüller E., (1993): Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms usány restriction-site analysis of PCR-amplified 16s rDNA, *Journal of General Microbiology* 139, 519-527.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully J.G., (eds.): *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, New York, Academic Press, pp. 369-380.
- Skrzeczowski L.J., Howell W.E., Eastwell K. C. (2001). Bacterial sequence interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Horticulturae* 550, 417-423.
- Suzuki s., Oshima k., S. Kakizawa, R. Arashida, H. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, M. Ugaki, S. Namba.(2005) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity *PNAS* 2006 , vol. 103 no. 11 4252–4257.
- The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004): 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1243–1255.