

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2012

Romana Pospíchalová

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Romana Pospíchalová

Název práce: Molekulární-biologická charakteristika fytoplazem ze skupiny Bermuda white leaf (16SrXIV) infikujících plevele na jižní Moravě

Typ práce (bakalářská, diplomová): bakalářská

Pracoviště : Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt: Fytoplazmy jsou mikroorganismy bez pevné buněčné struktury žijící v symbióze s rostlinami. Na hostitelské organismy jsou přeneseny pomocí hmyzích vektorů. Taxonomicky jsou rozděleny především podle sekvence konzervovaného genu 16S rDNA, do 16 skupin. Práce se zabývá charakteristikou a identifikací fytoplazem patřících do skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV) infikujících plevele na jižní Moravě. Fytoplazmy skupiny 16SrXIV se vyskytují téměř po celém světě, a infikují především jednodřevité rostliny, u kterých způsobují chlorózy a metlovitost. Hlavním zástupcem skupiny je Bermuda grass white leaf fytoplazma (*Candidatus Phytoplasma cynodontis*) parazitující hlavně na rostlinách trojklaného (Cynodon dactylon (L.) Pers.), vyskytující se nejvíce na asijském kontinentu. Molekulární genetické analýzy dvou vzorků fytoplazem izolovaných z pcháče osetu *Cirsium arvense* (L.) Scop., vyloučily jejich příslušnost ke skupině fytoplazem Bermuda grass white leaf (16SrXIV) a prokázaly jejich fylogenetickou příbuznost s fytoplazmami skupiny Rice yellow dwarf (16SrXI). Detailní analýza sekvence 16S rDNA genu naznačila možnost, že se jedná o nový druh fytoplazmy. Pro potvrzení této skutečnosti je nezbytné analyzovat variabilitu dalších, a to neribozomálních genů.

Klíčová slova: Fytoplazmy, Bermuda grass white leaf phytoplasma, trojklaný, *Cirsium arvense*, 16S rDNA gen

Počet stran : 49

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname : Romana Pospíchalová

Title: Molecular and biological characterization of phytoplasmas from Bermuda white leaf group (16SrXIV) infecting weeds of south Moravia

Type of thesis (bachelor, master): bachelor

Department: Katedra buněčné biologie a genetiky

Supervisor: RNDr. Pavla Válová

The year of presentation: 2012

Abstract: Phytoplasmas are wall-less microorganisms causing disease in hundreds of economically important plants. They are transmitted in the host organisms through the insect vectors. Taxonomically they are divided mainly according to the sequence of gene 16S rDNA into 16 groups. This work deals with characteristics and identification of phytoplasmas preliminary identified as members of group Bermuda grass white leaf (16SrXIV) infecting weeds on the South Moravia. Phytoplasmas of group 16SrXIV can be found almost all over the world, in particular they infect monocot plants, to which they cause chlorosis and witches-broom. The major representative phytoplasma of group is Bermuda grass white leaf phytoplasma (Candidatus *Phytoplasma cynodontis*). It parasitizes mainly on the plants Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), which can be found mostly on the Asian continent. Molecular-genetic analysis of two samples of phytoplasmas isolated from *Cirsium arvense* (L.) Scop. Excluded their count among to the group Bermuda grass white leaf (16SrXIV) and have shown their phylogenetic relationship with group Rice yellow dwarf (16SrXI). Detailed analysis of sequence 16S rDNA gene indicated the possibility that it is a new species of phytoplasma. To confirm this fact, it is necessary to analyze variability of other nonribosomal genes.

Keywords: Phytoplasmas, Bermuda grass white leaf phytoplasma, Bermudagrass, *Cirsium arvense*, 16S rDNA gene

Number of pages: 49

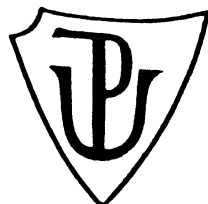
Number of appendices: 0

Language: Czech

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÁ
CHARAKTERISTIKA FYTOPLAZM ZE SKUPINY
BERMUDA WHITE LEAF (16SrXIV) INFIKUJÍCÍCH
PLEVELE NA JIŽNÍ MORAVĚ**

Bakalářská práce

Romana Pospíchalová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci dne _____

Chtěla bych poděkovat především RNDr. Pavle Válové za odborné vedení mé bakalářské práce, Prof. Milanu Navrátilovi za pomoc při zpracování výsledků a Mgr. Daně Mafákové za ochotnou pomoc při práci v laboratoři.

SOUHRN

Fytoplazmy jsou mikroorganismy bez pevné buněčné stěny způsobující onemocnění u stovek druhů rostlin. Na hostitelské organismy jsou přenášeny pomocí hmyzích vektorů. Taxonomicky jsou rozděleny především podle sekvence konzervovaného genu 16S rDNA, do 16 skupin. Práce se zabývá charakteristikou a identifikací fytoplazem především řasovitých do skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV) infikujících plevele na Jižní Moravě. Fytoplazmy skupiny 16SrXIV se vyskytují téměř po celém světě, a infikují především jednodřevité rostliny, u kterých způsobují chlorózy a metlovitost. Hlavním zástupcem skupiny je Bermuda grass white leaf fytoplazma (*Candidatus Phytoplasma cynodontis*) parazitující hlavně na rostlinách trojvlápníku prstnatého (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), vyskytující se nejvíce na asijském kontinentu.

Molekulární genetické analýzy dvou vzorků fytoplazem izolovaných z pcháče osetu *Cirsium arvense* (L.) Scop., vyloučily jejich příslušnost ke skupině fytoplazem Bermuda grass white leaf (16SrXIV) a prokázaly jejich fylogenetickou příbuznost s fytoplazmami skupiny Rice yellow dwarf (16SrXI). Detailní analýza sekvence 16S rDNA genu naznačila možnost, že se jedná o nový druh fytoplazmy. Pro potvrzení této skutečnosti je nezbytné analyzovat variabilitu dalších, a to neribozomálních genů.

SUMMARY

Phytoplasmas are wall-less microorganisms causing disease in hundreds of economically important plants. They are transmitted in the host organisms through the insect vectors. Taxonomically they are divided mainly according to the sequence of gene 16S rDNA into 16 groups. This work deals with characteristics and identification of phytoplasmas preliminary identified as members of group Bermuda grass white leaf (16SrXIV) infecting weeds on the South Moravia. Phytoplasmas of group 16SrXIV can be found almost all over the world, in particular they infect monocots plants, to which they cause chlorosis and witches-broom. The major representative phytoplasma of group is Bermuda grass white leaf phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma cynodontis). It parasites mainly on the plants Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), which can be found mostly on the Asian continent.

Molecular-genetic analysis of two samples of phytoplasmas isolated from *Cirsium arvense* (L.) Scop. Excluded their count among to the group Bermuda grass white leaf (16SrXIV) and have shown their phylogenetic relationship with group Rice yellow dwarf (16SrXI). Detailed analysis of sequence 16S rDNA gene indicated the possibility that it is a new species of phytoplasma. To confirm this fact, it is necessary to analyze variability of other nonribosomal genes.

OBSAH

1 Cíle práce	8
2 Úvod	9
3 Literární přehled.....	10
3.1 Obecná charakteristika fytoplazem.....	10
3.1.1 Genom fytoplazem.....	11
3.1.2 Hostitelé a vektor fytoplazem.....	11
3.2 Metody detekce a identifikace fytoplazem	12
3.3 Fylogeneze a taxonomie fytoplazem.....	13
3.4 Fytoplazmy skupiny 16SrXIV.....	15
3.4.1 Bermuda grass white leaf fytoplazma.....	15
3.4.1.1 Obecný popis.....	15
3.4.1.2 Výskyt a variabilita BGWL fytoplazmy.....	16
3.4.1.3 Hostitelé BGWL fytoplazmy.....	17
3.4.2 Ostatní fytoplazmy skupiny 16SrXIV a jejich genetická variabilita.....	20
3.4.3 <i>Cirsium arvense</i> jako možný hostitel BGWL fytoplazem.....	22
4 Materiál a metody.....	25
4.1 Rostlinný materiál a použité vzorky.....	25
4.2 Detekce fytoplazmy pomocí 'nested' PCR.....	25
4.2.1 'Direct' a 'nested' PCR.....	25
4.2.2 Detekce produktů PCR pomocí gelové elektroforézy.....	27
4.3 Izolace PCR produktu.....	27
4.4 Klonování PCR produktu.....	28
4.4.1 Ligace.....	28
4.4.2 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	28
4.5 Testování pozitivních kolonií.....	29
4.6 Sekvencování.....	30
4.6.1 Izolace produktů PCR reakce s primery M13f/M13r.....	30
4.6.2 Příprava sekvencovací směsi.....	31
4.7 Bioinformatické analýzy.....	31
4.8 Použité roztoky a přístrojové vybavení.....	32

5 Výsledky.....	34
6 Diskuze.....	40
7 Záv r.....	42
8 Seznam použité literatury.....	43
9 Seznam použitých zkratek	47
10 Přílohy.....	48

1 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární re-er-e zam ěné na problematiku genetické variability fytoplazem ze skupiny Bermuda white leaf (16SrXIV).

2. Experimentální ást:

Izolace vybraných segment 16S rDNA z izolát fytoplazem získaných z *Cirsium arvense* na jifní Morav , p edb fln za azených do skupiny 16SrXIV, jejich multiplikace v pGEM-T plazmidu, sekvencování (ABI PRISM 3730) a fylogenetická analýza získaných sekvencí 16S rDNA (GenBank, BLAST, iPhyClassifier, MEGA).

2 ÚVOD

Předložená práce se zabývá molekulárně biologickou charakteristikou fytoplazem, patřících do skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV) infikující plevel na jižní Moravě. Fytoplazmy byly detekovány v rostlinách pcháč osetu (*Cirsium arvens* (L.) Scop.) pomocí PCR amplifikace a analýzy sekvence produktu. Tyto sekvence byly následně fylogenetickou analýzou porovnány se sekvencemi fytoplazem skupiny Bermuda white leaf a Rice yellow dwarf, získaných z databáze GenBank.

Fytoplazmy patří mezi intrabuněčné patogeny flující v sítkovicích rostlin a slinných flázách hmyzu, který zároveň slouží jako vektor. Jsou to prokaryotní organismy bez buněčné stěny, nejsou kultivovatelné in vitro, což dlouhou dobu znemožňovalo jejich správný popis a zjištění. Jejich studium je velmi důležitě protože napadají velké množství rostlinných, často hospodářsky významných hostitelů, u kterých způsobují nejčastěji floutenky, proliferaci, zakrnění aflorování rostliny a mají tedy velký ekonomický význam. Už na počátku devatenáctého století byly popisovány floutenky, které jak už dnes víme, byly způsobeny fytoplazmami. Tehdy se však předpokládalo, že původcem chorob jsou viry. Později byly tyto netradiční organismy popsány jako organismy podobné mykoplazmám (MLOs) na základě podobnosti buněk, pozorovaných elektronovým mikroskopem. Teprve s rozvojem metod molekulární biologie bylo možné správně charakterizovat jednotlivé fytoplazmy izolované z různých druhů napadených rostlin, stanovit jejich genetickou příbuznost a vytvořit jejich taxonomickou klasifikaci.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Obecná charakteristika fytoplazem

Triviální název fytoplazma byl přijat pro nehelikální prokaryota bez buněčné stěny, tvořící monofyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes*, dříve známé jako mykoplasmatům podobné organismy (mycoplasma like organisms, MLOs) (IPRCM, 2004).

První důkazy o tom, že některé choroby rostlin jsou spojeny s napadením floému prokaryotickými organismy, které jsou podobné mykoplasmatům, poprvé prezentoval Doi a spolupracovníci jifi v roce 1967. Dnes už víme, že fytoplazmy způsobují choroby u stovek ekonomicky důležitých rostlin (Bai *et al.*, 2006). Onemocnění spojené s fytoplazmami se šíří po celém světě a v několika případech jsou spojeny s trvalými epidemiemi (Bertaccini, 2007). Fytoplazmy osídlují sítkovce floému a velmi zřídka také parenchymatické buňky cévnatých rostlin a hemolymfu, slinné žlázy a jiné orgány hmyzu. V hmyzích hostitelích může infekce způsobit předčasnou úmrtnost. V rostlinných hostitelích může vyvolat komplexní syndromy s konkrétními příznaky, jako jsou například virescence, chlorózy, sterilita květů, zakrslost, proliferace axilárních výhonků a mnoho dalších, často méně specifických příznaků (Lee *et al.*, 2000). Podobné příznaky mohou být vyvolané odlišnými druhy fytoplazem, zatímco nesourodé symptomy lze vyvolat úzce souvisejícími fytoplazmami. Fytoplazmy jsou nejčastěji přenášeny pomocí hmyzích vektorů řádu Hemiptera. (Lee *et al.*, 1998). Častá je také společná infekce rostlin a hmyzu fytoplazmou a spiroplazmou (Bai *et al.*, 2006). Mezi nejbližší postupy kontroly chorob způsobených fytoplazmami patří použití insekticidy, které brání hmyzím vektorům přenosu fytoplazem na zdravé rostliny a také odstanění infikovaných rostlin (Hogenhout *et al.*, 2008).

Fytoplazmy jsou obklopeny jednoduchou membránou, nemají pevné buněčné stěny a jsou proto pleomorfního tvaru s průměrem 200–800 nm (Doi *et al.*, 1967, cit. Bertaccini, 2007). Morfologií a ultrastrukturou jsou podobné mykoplasmatům, které jsou významnými patogeny lidí a zvířat (Seemüller *et al.*, 1998). Bylo zjištěno, že fytoplazmy jsou citlivé na antibiotika tetracyklinové skupiny, ale ne na penicilin (Ishii *et al.*, 1967, cit. The IPRCM, 2004) a jejich membrány jsou odolné vůči digitoninu a citlivé na hypotonické roztoky solí (Lim *et al.*, 1992).

Fytoplazmy prozatím nebyly kultivovány v cell-free médiu což ukazuje, že mají různé metabolizmy a pravděpodobně mají více omezené genomy než jiní zástupci *Mollicutes* (Bai *et al.*, 2006).

3.1.1 Genom fytoplazem

Velikost genomu se pohybuje od 530 do 1350 kb, je tvořen převážně kruhovitými molekulami podobně jako u bakterií a u jednotlivých skupin fytoplazem se liší, což naznačuje, že došlo ke ztrátě určitého množství genetického materiálu fytoplazem tvořících různé fylogenetické skupiny (Marcone *et al.*, 1999). Největší rozsah velikosti genomu byl zjištěn u skupiny X-disease group (670-1075 kb) a u Aster yellow group (660-1130 kb). U ostatních skupin je tento rozsah velikostí ušší. Nejmenší chromozóm, 530 kb, byl nalezen v izolátech fytoplazmy Bermuda grass white leaf (BGWL) (Marcone *et al.*, 1999).

Fytoplazmy mají genom bohatý na repetice, které jsou uspořádány do velkých klastrů potenciálních mobilních jednotek, dále jen PMU, které umožňují vytvoření variability a zdají se být jedinečné pro fytoplazmy. PMU elementy obsahují geny pro membránové proteiny a jsou tedy důležitě v interakci s prostředím. Expresce těchto genů může nastat procesem cirkulace a replikací transpozice a její regulace je jednou ze strategií pro přizpůsobení se různým prostředím. Genomové přesmyky prostřednictvím expansí a delecí PMUs jsou evolučním faktorem umožňujícím fytoplazmám infikovat široké spektrum hostitelů a přizpůsobit se různým vektorům (Bai *et al.*, 2006).

DNA má nízký obsah bazí G-C (asi 23-26 %), což bylo první molekulární charakteristikou naznačující blízký vztah k *Mollicutes* (Kollar *et Seemüller*, 1989). Fytoplazmy používají UGA jako stop kodon a ne jako kodon tryptofanu, stejně jako u některých mykoplazm (Lim a Sears, 1991).

3.1.2 Hostitelé a vektorů fytoplazem

Přirozeným hostitelem fytoplazem jsou rostliny a hmyz. Hmyz slouží především k přenosu fytoplazem na rostlinné hostitele. Okruh hostitelských rostlin a hmyzích vektorů se u jednotlivých fytoplazem liší. Některé fytoplazmy mají nízkou specifitu k hmyzím vektorům (např. Peach-X disease phytoplasma, California aster yellows phytoplasma atd.), zatímco jiné

mohou být patogeny jediným konkrétním druhem hmyzu (např. Sugarcane white leaf phytoplasma, Pear decline phytoplasma). Fytoplazmy mají speciální povrchové membránové proteiny, tzv. antigenní membránový protein (Amp), který není homologní s žádným jiným funkčním proteinem a jeho interakce s mikrofilamenty hmyzu určuje specifitu vektora. Amp tvoří komplex s mikrofilamenty viscerální hladké svaloviny středního traktu hmyzu a vznik tohoto komplexu koreluje se schopností hmyzu přenést fytoplazmy (Suzuki *et al.*, 2005). Obvyklé je latentní období, ve kterém je hmyz nakáfen, ale není schopen přenést patogen na zdravé rostliny, toto období může trvat od několika hodin do několika týdnů (Bertaccini, 2007). Úroveň přirozených rostlinných hostitelů je do značné míry stanoven po druh přirozených vektorů a také jejich potravní strategií (mono-, oligo-, polyfágní druhy). Důležitá je také vnímavost rostlin na danou fytoplazmu (Lee *et al.*, 1998).

3.2 Metody detekce a identifikace fytoplazem

Fytoplazmy mohou být detekovány různými způsoby, od nejjednoduššího pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie až po specifické sérologické a molekulární metody. Průběh rozvoje molekulárních metod umožnil hlubší studium těchto netradičních organismů.

Nejjednodušší metodou detekce fytoplazem je fluorescenční mikroskopie, při které jsou tenké řezy připravené z různých částí rostlin barveny fluorescenčním barvivem DAPI (4-6-diamidino-2-fenylindol.2 HCl). Fytoplazmy jsou pak v sítkovicích pozorovány jako výrazně modro-bíle fluoreskující shluky. Touto metodou však nedokážeme fytoplazmy identifikovat. Možná je také detekce fytoplazem elektronovou mikroskopií, díky které můžeme také určit jejich tvar a velikost (Fránová *et al.*, 2008).

Jako vysoce specifické metody jsou pro detekci a identifikaci fytoplazem používány imunologické analýzy, které však nejsou příliš rozšířené. Využívány jsou metody Plate-Trapped Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA) a Immunoblotting test (DIBA), který je sice méně citlivý než PTA-ELISA, ale umožňuje zpracování v takovém množství vzorků ve stejném směru (Biabani *et al.*, 2011).

Nejčastěji používanými metodami jsou různé metody molekulární biologie, mezi které patří především amplifikace polymerázovou a zovou reakcí. PCR amplifikace je velmi účinná metoda detekce fytoplazem, její využitelnost je však závislá na množství fytoplazem ve směru hostitelské rostliny a je zde také riziko kontaminace. Jako templát pro tuto reakci byl

zvolen vysoce konzervovaný gen 16S rDNA a části jeho sekvence jsou použity jako primery. Produkty PCR mohou být dále tříděny restrikčními endonukleázami technikou Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), jejím výsledkem jsou odlišné restrikční profily různých skupin fytoplazem, a je tak možná jejich přesná identifikace (Ahrens *et Seemüller*, 1992). Techniku RFLP lze provést také *in silico* ze získaných sekvencí PCR-produktů (Wei *et al.*, 2007). Další významnou technikou je sekvencování PCR-produktů, díky kterému jsou získány unikátní sekvence genů, které lze kromě virtuální RFLP použít ke srovnání se sekvencemi dostupnými v databázích.

3.3 Fylogeneze a taxonomie fytoplazem

Fylogenetický strom *Mollicutes* se skládá ze dvou hlavních větví, které se rozvíjely na začátku vývoje (Lee *et al.*, 2000). Jedna větev obsahuje Achleplasmatales a Anaeroplasmatales, a druhá větev obsahuje mycoplasmatales a entomoplasmatales (Bai *et al.*, 2004). Fytoplazmy tvoří monofyletickou skupinu v rámci achleplasmatales (Lee *et al.*, 2000). Nejblíže identifikovanými příbuznými fytoplazmami jsou *Achleplasma palmae* a *A. modicum* (Lee *et al.*, 1998).

Fylogenetické analýzy různých genů potvrdily, že se jedná o monofyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes*. Rod byl označen názvem *Candidatus* phytoplasma a vzhledem k rozmanitosti se pak dále dělí na jednotlivé subtaxony (IRPCM, 2004). Na základě podobnosti 16S rDNA genových sekvencí byly v rámci *Candidatus* phytoplasma navrženy skupiny. V Tab. 1 je uvedeno 16 fylogenetických skupin fytoplazem tak, jak je uvádí IRPCM (2004). Srovnávací sekvencí analýzu 16S rDNA genů navrhl v roce 1987 Woese a dodnes se využívá jako univerzální fylogenetický marker pro klasifikaci hlavních skupin prokaryot. Fytoplazmy byly do těchto skupin přiděleny i podle jiných molekulárních údajů, jako například RFLP analýza, hybridizace nukleové kyseliny, a sérologického srovnání (Seemüller *et al.*, 1998). IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team stanovil v roce 2000 pravidla pro definování druhu v rámci *Candidatus* phytoplasma. Obecně může být fytoplazma popsána jako samostatný druh, pokud podobnost její 16S rDNA genové sekvence je menší než 97,5 % s jakýmkoliv dříve popsaným druhem *Ca. Phytoplasma*. Mohou však být případy, kdy je podobnost sekvencí větší než 97,5 %, ale fytoplazma může být definována jako samostatný druh, pokud splňuje jiné charakteristiky, například jedná se o ekologicky oddělenou populaci, je-li přítomná prostřednictvím různých vektorů a má různé rostlinné hostitele a existuje dokaz o

molekulární variabilit , získané hybridizací klonované DNA nebo sérologickou reakcí. V tomto případě může být fytoplazma definována jako samostatný druh (IRPCM, 2004).

Tab. . 1: Taxonomické rozdělení fytoplazem na skupiny porovnáním sekvencí 16SrRNA genu (podle IRPCM, 2004)

16Sr skupina	Název skupiny	Druh fytoplazmy
16SrI	Aster yellows group	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i> *
		<i>Ca. Phytoplasma japonicum</i>
16SrII	Peanut witches - broom group	<i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i>
16SrIII	X - disease group	<i>Ca. Phytoplasma pruni</i> *
16SrIV	Coconut lethal yellowing group	<i>Ca. Phytoplasma palmae</i>
		<i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i>
		<i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i>
		<i>Ca. Phytoplasma castaneae</i>
16SrV	Elm yellows group	<i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i>
		<i>Ca. Phytoplasma vitis</i>
		<i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> *
16SrVI	Clover proliferation group	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i>
16SrVII	Ash yellows group	<i>Ca. Phytoplasma fraxini</i>
16SrVIII	Loofah witches - broom group	<i>Ca. Phytoplasma luffae</i>
16SrIX	Pigeon pea witches - broom group	<i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i>
16SrX	Apple proliferation group	<i>Ca. Phytoplasma mali</i> *
		<i>Ca. Phytoplasma pyri</i> *
		<i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> *
		<i>Ca. Phytoplasma spartii</i>
		<i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> *
		<i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i>
16SrXI	Rice yellow dwarf group	<i>Ca. Phytoplasma oryzae</i>
16SrXII	Stolbur group	<i>Ca. Phytoplasma australiense</i>
		<i>Ca. Phytoplasma solani</i> *
16SrXIV	Bermuda grass white leaf group	<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i>
16SrXV	Candidatus phytoplasma brasiliense group	<i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i>
16SrXIII	Mexican periwinkle virescence group	název nebyl navržen

* fytoplazmy vyskytující se v ČR podle pohledu Navrátil *et al.* (2008)

V dalších kapitolách se práce zabývá konkrétními fytoplazmami a to skupinou Bermuda grass white leaf (16SrXIV). O výskytu této skupiny v České republice není zatím publikována žádná zpráva. Její charakteristika a následná identifikace v rostlinách pěstovaných je důležitá pro rozšíření spektra fytoplazem vyskytujících se na území České republiky.

3.4 Fytoplazmy skupiny 16SrXIV

Podle údaj v databázi GenBank do skupiny Bermuda grass white leaf 16SrXIV patří fytoplazmy - Bermuda grass white leaf phytoplasma, Cynodon white leaf phytoplasma, Chinese Bermuda grass white leaf phytoplasma, Coconut yellow decline phytoplasma, Date palm slow decline phytoplasma, Juyom (Iran) Bermuda grass white leaf phytoplasma, Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma a White tip die-back phytoplasma. Podle Seemüller *et al.* (1998), jsou do této skupiny azeny také Annual blue grass white leaf phytoplasma, Brachiaria white leaf phytoplasma a Dactyloctenium white leaf phytoplasma. Nejrozšířenějším zástupcem skupiny 16SrXIV je Bermuda grass white leaf phytoplasma, její charakteristika je popsána v následující kapitole.

3.4.1 Bermuda grass white leaf (BGWL) phytoplasma

3.4.1.1 Obecný popis

Fytoplazma Bermuda grass white leaf (BGWL) způsobuje destruktivní onemocnění především u rostlin *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (troskut prstnatý) a poprvé byla detekována na Tchaj-wanu (Chen *et al.*, 1972, cit. Marcone *et al.*, 2004). Charakteristickými symptomy tohoto onemocnění jsou především rozsáhlé chlorózy, proliferace, metlovitost, malé listy, zkrácení oddenků, kořen a zakrnění a odlomění rostliny (Marcone *et al.*, 1997). Infekce rostlin BGWL fytoplazmou je v synergickém vztahu s infekcí vyvolanou bakterií *Clavibacter xyli*, která také napadá rostliny troskutu a způsobuje jejich zakrnění (Davis *et al.*, 1984). Pro posouzení rizika, které by fytoplazma BGWL mohla představovat pro zemědělské plodiny, je nutné stanovit, zda je možný její přenos na tyto rostlinné druhy. Přenos na cukrovou třtinu druhem *Matsumuratettix hiroglyphicus* nebyl dokázán (Marcone *et al.*, 2004).

Velikost genomu této fytoplazmy je 530 Kb, což je nejmenší genom nejen mezi fytoplazmami, ale i v rámci všech známých sebereplikujících se organismů (Marcone *et al.*, 1999).

Fytoplazma BGWL obsahuje jedinou sekvenci: 5'-AATTAGAAGGCATCTTTTAAT-3' v pozici 169-189 nt, která se nevyskytuje v žádném jiném organismu (Marcone *et al.*, 2004).

3.4.1.2 Výskyt a variabilita BGWL fytoplazmy

Fytoplazma BGWL je dnes rozšířena v mnoha teplých zemích téměř na všech kontinentech (Marccone *et al.*, 1997). Taxonomická studie, kterou provedli Marccone *et al.* (2004), ukázala na základě sekvenčních analýz 16S rDNA a 16S-23S rDNA, že fytoplazmy izolované z *Cynodon dactylon* jsou stejné nebo téměř stejné a navrhl jejich zařazení do *Candidatus Phytoplasma cynodontis* (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled izolátů *Candidatus Phytoplasma cynodontis* (GenBank)

Accession number	Izolát	Hostitel	Výskyt
AB052871	BGWL-KK	<i>Cynodon dactylon</i>	Thajsko
AB302896	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Indie
AB302897	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Indie
AB302898	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Indie
AF100412	BGWL-S	<i>Cynodon dactylon</i>	Súdán
AF248961	BGWL-T	<i>Cynodon dactylon</i>	Thajsko
AJ550984	BGWL-C1	<i>Cynodon dactylon</i>	Itálie
AJ550985	BGWL-C2	<i>Cynodon dactylon</i>	Itálie
AJ550986	BGWL-CA	<i>Cynodon dactylon</i>	Itálie
Y16388	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Itálie
AY484406	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Thajsko
AY725238	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Kuba
EU032485	Gorakhpur	<i>Cynodon dactylon</i>	Indie
EU377477	KF-C1	<i>Cynodon dactylon</i>	Ína
EU409293	LY-C1	<i>Cynodon dactylon</i>	Ína
EU999999	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Ína
FJ348654	-	<i>Dichanthium annulatum</i>	Indie
GQ403690	BGWL-Op.bu.	<i>Oplismenus burmannii</i>	Indie
GQ403689	BGWL-Di.sa.	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Indie
GU124634	-	<i>Cynodon dactylon</i>	Indie
GU826532	-	<i>Discodermia sp.</i> (houba)	Bahamy
GU826557	-	<i>Discodermia sp.</i> (houba)	Bahamy

V roce 1975 byla poprvé popsána fytoplazma BGWL v Thajsku Maramoroschem *et al.* (Marccone *et al.*, 1997). *Cynodon dactylon* je všeobecně rozšířen také v Pákistánu, a testy prokázaly, že je často napadán BGWL fytoplazmou, která se zdá být srovnatelná s thajskými kmeny (Zahoor Ahmad *et al.*, 1995). Fytoplazmy detekované v Indii ve východní oblasti provincie Uttar Pradesh sdílí s kmeny *Candidatus phytoplasma cynodontis* podobnost od

99,2 % (iránský izolát: EF444486) do 99,9 % (thajské izoláty: AB052871 a AF248961). S referenčním kmenem BGWL-C1 (AJ550984) sdílí sekvenční podobnost 99,7 % (Rao *et al.*, 2007).

V roce 1996 byla tráva troskut s chlorotickými listy pozorována v ovocných sadech, zeleninových polích i na neobdělávaných plochách v regionech Latium a Campania ve střední a jižní Itálii. Jednalo se o první zprávu o přítomnosti BGWL fytoplazmy v Evropě (Marcione *et al.*, 1997). Jako referenční izolát byl zvolen italský izolát BGWL-C1. Všechny italské izoláty - BGWL-C1, BGWL-C2 a BGWL-CA mají stejné 16S rDNA sekvence, zatímco thajský izolát BGWL-T se od nich liší ve 4 pozicích nukleotid (Marcione *et al.*, 2004). Z těchto údajů lze dojít k závěru, že analyzované izoláty BGWL fytoplazmy jsou velmi jednotné a lze je považovat za jediný druh (Marcione *et al.*, 2004).

Kromě Asie a Evropy byl výskyt fytoplazmy BGWL potvrzen i v Africe. Na africkém kontinentu byla infekce *Cynodon dactylon* BGWL fytoplazmou poprvé popsána v Súdánu (Dafalla *et Cousin*, 1988). V roce 2010 byla publikována první zpráva potvrzující výskyt BGWL fytoplazmy v Keni. Rostliny *Cynodon dactylon* vykazující příznaky infekce BGWL fytoplazmou byly pozorovány v západní Keni v oblasti Mbita a Bungoma. *Cynodon dactylon* zde má význam jako pícnina, BGWL fytoplazma má tedy hospodářský význam, nebo s postupující infekcí kvalita pastvin klesá (Obura *et al.*, 2010).

3.4.1.3 Hostitelé BGWL fytoplazmy

Hlavním hostitelem Bermuda grass white leaf phytoplazmy je, jak již bylo uvedeno výše, *Cynodon dactylon* (troskut prstnatý), byla však detekována i v rostlinách *Dichanthium annulatum*, *Oplismenus burmannii* a *Digitaria sanguinalis*. Všechny tyto rostliny jsou trávy patřící do čeledi *Poaceae* (lipnicovité) a ve všech případech se jednalo o izoláty z Indie (viz. Tab. 3). BGWL fytoplazma izolovaná z trávy *Dichanthium annulatum* (FJ348654) vykazuje 98,1% podobnost sekvence 16S rDNA s malajským izolátem BGWL fytoplazmy (EU294011) a 99,1% podobnost s izolátem íránským (EU999999) (Rao *et al.*, 2009). Izoláty BGWL fytoplazmy z rostlin *Oplismenus burmannii* (GQ403690) a *Digitaria sanguinalis* (GQ403689) mají sekvenci 16S rDNA mezi sebou shodnou z 98 %. Se stejnou BGWL fytoplazmou (italský izolát AJ550984 a íránský izolát EF444485) byla podobnost této sekvence 99 % (Rao *et al.*, 2010). Fytoplazma BGWL byla zjištěna také v houbě *Discodermia sp.*

Výsledky sekvenčních analýz BGWL fytoplazmy detekovaných v *Discodermia sp.* (GU826532, GU826557) na Bahamách uvedené v databázi GenBank nebyly dosud publikovány. Seznam známých hostitelů BGWL je uveden v Tab. 3.

Tab. 3: Hostitelé BGWL fytoplazmy

Hostitel	Jiný název	Autoři
<i>Cynodon dactylon</i>	Bermuda Grass, Couch grass, troskut prstnatý	Chen <i>et al.</i> , 1972, cit. Marcone <i>et al.</i> , 1997
<i>Dichanthium annulatum</i>	bluestem, Kleberg bluestem	Rao <i>et al.</i> , 2009
<i>Oplismenus burmannii</i>	Burmann's basketgrass	Rao <i>et al.</i> , 2010
<i>Digitaria sanguinalis</i>	hairy crabgrass, rosička krvavá	Rao <i>et al.</i> , 2010
<i>Discodermia sp.</i>		Bruck <i>et al.</i> , 2010, GenBank nepublikováno

Cynodon dactylon, je vytrvalá rostlina z čeledi *Poaceae* (lipnicovité), která pochází z oblasti Středozemního moře, ale je nyní široce rozšířena v mnoha teplých zemích světa (Chen *et al.*, 1972, cit. Marcone *et al.*, 1997). V České republice se vyskytuje roztroušeně na jihovýchodní Moravě, na jiném území ČR byl ojedinelé zavlečen. Nejčastěji roste na písčinách, cestách, seřezávaných plochách a vinicích (Kubát, 2002). Zdravá rostlina bez příznaků nákazy je na Obr. 1, rostlina s příznaky chlorózy a metlovitost na Obr. 2.

Obr. . 1: *Cynodon dactylon* (L.) Pers.
(http://www.vurv.cz/weeds/cz/html/invazni_plevele/troskut_prstnaty_cynodon_dactylon.htm)



Obr. . 2: Metlovitost a chloróza u rostliny *Cynodon dactylon* zp sobená fytoplazmou Bermuda grass white leaf (Obura *et al.*, 2010)



3.4.2 Ostatní fytoplazmy skupiny 16SrXIV a jejich genetická variabilita

Do skupiny 16SrXIV jsou kromě fytoplazem *Candidatus Phytoplasma cynodontis*, které byly charakterizované v předchozí kapitole, i patogeny *Cynodon white leaf phytoplasma* (CWL), Chinese Bermudagrass white leaf phytoplasma, Coconut yellow decline (CYD) phytoplasma, Date palm slow decline phytoplasma, Juyom (Iran) Bermuda grass white leaf phytoplasma, Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma a White tip die-back phytoplasma. Seznam fytoplazem skupiny Bermuda grass white leaf získaných z databáze GenBank je uveden v Tab. 4.

Na australském kontinentu byla v rostlinách *Cynodon dactylon* identifikována **Cynodon white leaf phytoplasma** (AF509321), která způsobuje žloutnutí listů tohoto plevele (Blanche *et al.*, 2003). Tento izolát vykazuje pouze jeden polymorfismus v porovnání s thajským izolátem Bermuda grass white leaf phytoplasmy (BGWL) a ti jen polymorfismy v porovnání s italskými izoláty BGWL a může být tedy součástí BGWL fytoplazem (Macone *et al.*, 2004).

Zástupce skupiny 16SrXIV parazitující na kokosové palmě *Cocos nucifera* (kokosovník o echoplodý) je fytoplazma **Coconut yellow decline phytoplasma** (CYD, EU328159, EU636906) a její výskyt byl popsán na území Malajsie. Mezi hlavní symptomy patří chlorózy, floutnutí listů a předčasný opad plodů. Sekvenční analýza ukázala 99% podobnost sekvence genu 16S rRNA s Bermuda grass white leaf fytoplazmou z Thajska (AF248961). V Malajsii byl pozorován také *Cynodon dactylon* vykazující příznaky nákazy fytoplazmou, která byla identifikována jako **Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma** (EU294011) (Nejat *et al.*, 2009).

Fytoplazmou způsobující choroby palmě *Phoenix dactylifera* na území Súdánu je **Date palm slow decline phytoplasma** (AF268000), která napadá již dospělé palmy a způsobuje na daném území stálé roční ztráty na úrodu cca 6%. Hlavním symptomem je floutnutí a flouknutí listů. Po první známce tohoto příznaku rostlina během 12 - 24 měsíců odumírá (Cronje *et al.*, 2000a).

Fytoplazmy popsané na území Íránu jsou Firoozabad **Bermuda grass white leaf phytoplasma** (DQ195215, EF444485) a **Juyom (Iran) Bermuda grass white leaf**

phytoplasma (DQ195215), tyto výsledky jsou dostupné v databázi GenBank, dosud však nebyly publikovány.

White tip die-back phytoplasma (WTD) je fytoplasma způsobující stejnojmennou chorobu u datlových palm *Phoenix dactylifera* zjištěná na severu Súdánu. Fytoplasma napadá mladé palmy, u kterých vyvolává závažné chlorózy končící během 6 - 12 měsíců odumřením rostliny. Chlorotické pruhy jsou bílé, s nekrózou a postupně se šíří podél celého listu. Sekvencování 16S/23S rDNA ukázalo 99% homologii se sekvencemi kmen BGWL fytoplazem ze Súdánu (AF100412). Tato sekvence je v databázi GenBank s Acc. No. AF100411 (Cronje *et al.*, 2000b).

Tab. 4: Fytoplazmy skupiny Bermuda grass white leaf (GenBank)

Accession number	Druh fytoplazmy	Hostitel	Výskyt
AF100411	White tip die-back phytoplasma	<i>Phoenix dactylifera</i>	Súdán
AF268000	Date palm slow decline phytoplasma	<i>Phoenix dactylifera</i>	Súdán
EU328159	Coconut yellow decline phytoplasma	<i>Cocos nucifera</i>	Malajsie
EU636906	Coconut yellow decline phytoplasma	<i>Cocos nucifera</i>	Malajsie
EU294011	Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma	<i>Cynodon dactylon</i>	Malajsie
AF509321	Cynodon white leaf phytoplasma	<i>Cynodon dactylon</i>	Austrálie
DQ195215	Firoozabad Bermuda grass white leaf phytoplasma	hostitel neúveden	Irán
EF444485	Firoozabad (Iran) Bermuda grass white leaf phytoplasma	hostitel neúveden	Irán
EF444486	Juyom (Iran) Bermuda grass white leaf phytoplasma	hostitel neúveden	Irán

Do skupiny 16SrXIV jsou dále zařazeny fytoplazmy uvedené v Tab. 5 - **Annual blue grass white leaf (ABGWL) phytoplasma, Brachiaria white leaf (BraWL) phytoplasma a Dactyloctenium white leaf (DACWL) phytoplasma.** Tyto fytoplazmy způsobují chlorózy u trav *Poa annua* (lipnice rovní), *Brachiaria dystachya* a *Dactyloctenium aegyptium* (hřebenatka egyptská) (Seemüller *et al.*, 1998).

Podobnost ABGWL fytoplazmy s BGWL fytoplazmou byla zjištěna RFLP analýzou, při které poskytla stejný restriční profil řezáním rzcími endonukleázami. Tato fytoplasma byla detekována v Itálii v symptomatických rostlinách *Poa annua*, které jsou v mírném pásu hojně rozšířeným plevelem (Lee *et al.*, 1997).

V Thajsku byly pozorovány symptomy chlorózy nejen u rostlin *Cynodon dactylon*, ale také u trav *Brachiaria sp.* a *Dactyloctenium aegyptium* (Nakashima *et al.*, 1996). Fytoplazma BraWL zp sobující chlorózu list u rostlin *Brachiaria distachya* souvisí velmi úzce s BGWL fytoplazmou. Li-í se v p ti pozicích od kmene BGWL-T a v devíti pozicích od italského kmene, cofil odpovídá afl 99,7 a 99,4% 16S rDNA sekven ní podobnosti (Marccone *et al.*, 2004).

Tab. . 5: Fytoplazmy skupiny Bermuda white leaf group podle Seemüller *et al.*, 1998

Druh fytoplazmy	Hostitel	Výskyt	Auto i
Bermuda grass white leaf	<i>Cynodon dactylon</i>	Itálie, Thajsko, Indie	Sarindu <i>et Clark</i> , 1993; Marccone <i>et al.</i> , 1997
Annual blue grass white leaf	<i>Poa annua</i>	Itálie	Lee <i>et al.</i> , 1997
Brachiaria white leaf	<i>Brachiaria distachya</i>	Thajsko	Sarindu <i>et Clark</i> , 1993
Dactyloctenium white leaf	<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	Thajsko	Nakashima <i>et al.</i> , 1996

3.4.3 *Cirsium arvense* jako mofný hostitel BGWL fytoplazem

V p edchozích kapitolách byly shrnuty fytoplazmy napadající jednod lofné rostliny *Cynodon dactylon*, *Dichanthium annulatum*, *Oplismenus burmannii*, *Digitaria sanguinalis*, *Phoenix dactylifera*, *Cocos nucifera*, *Poa annua*, *Brachiaria distachya* a *Dactyloctenium aegyptium*. Byly v-ak popsány také fytoplazmy BGWL skupiny u rostlin *Cirsium arvense* (Schneider *et al.*, 1997) a *Galactia tenuifolia* (Padovan *et al.*, 1999, cit. Marccone *et al.*, 2004), které pat í mezi rostliny dvoud lofné.

Cirsium arvense (pchá oset, Obr. . 3 afl 5) je vytrvalá bylina z eledi *Asteraceae* (hv zdnicovité) pod eledi *Carduoideae* (bodlákové) (Kubát, 2006). Je roz-í ená tém po celém sv t a v eské republice pat í mezi hojn zastoupené plevely (www.botany.cz).

Obr. . 3 a 4: Kv tenství a listy *Cirsium arvense* (L.) Scop.
(<http://botany.cz/cs/cirsium-arvense/>)



Obr. . 5: *Cirsium arvense* s p íznaky chlorózy a proliferace
(foto Pavla Válová)



U *C. arvense* bylo detekováno více druhů fytoplazem. Mezi fytoplazmy napadající pchá na území České republiky patří fytoplazmy skupiny Aster yellows 16SrI-B (Navrátil *et al.*, 2008) a fytoplazmy skupiny stolburu (16SrXII), které byly detekovány na jižní Moravě v pchá i, který vykazoval zakrnění, proliferaci, floutnutí a malformace (Fialová *et al.*, 2009).

Fytoplazmy obou těchto skupin, Aster yellows i stolburu, se kromě pchále vyskytují u i jiných plevelných rostlin.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál a použité vzorky

Pro experimentální část této práce, detekci fytoplazmy ve vzorku podezřelém z infekce fytoplazmou Bermuda grass white leaf, byly vybrány dva vzorky rostlin pchá osetu (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) sbíraných v katastru obce Lednice na jihu Moravy. Tyto rostliny při sběru vykazovaly příznaky chlorózy a proliferace. Pracovníky Laboratoře molekulární biologie organismů, Katedry buněčné biologie a genetiky, byla provedena izolace DNA (modifikovaná CTAB metoda podle Ahrens *et* Seemüllera, 1992) a vzorky byly po lyofilizaci zamrazeny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozpuštění vzorků v deionizované vodě byly vzorky stanoveny na minicentrifuze a pomocí Nanodrop1000 (Thermo Scientific) byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA. Koncentrace DNA byla upravena na koncentraci optimální pro PCR-reakci, a to 50 - 100 ng/μl. Seznam vzorků a jejich charakterizace byl zaznamenán do Tab. 6.

Tab. 6: Popis vzorků

íslo izolátu	Datum sběru	Datum izolace DNA	Hostitel	Lokalita	ce DNA [ng/μl]	ední pro PCR
CZ2682	1.9. 2006	15.9. 2006	pchá oset	Lednice /pole paprika	74,1	1,5x
CZ2813	23.4. 2007	30.4. 2007	pchá oset	Lednice/pole petržel	138,2	2,5x

4.2 Detekce fytoplazmy pomocí 'nested' PCR

4.2.1 'Direct' a 'nested' PCR

Pro detekci fytoplazmy byla použita dvoukroková 'nested' PCR. V prvním kroku, 'direct' PCR byla provedena amplifikace s pomocí univerzálních primerů P1/P7 (viz Tab. 13). Byla připravena PCR-reakční směs pro 3 vzorky, její složení je uvedeno v Tab. 7. Všechny složky byly během přípravy směsi uchovávány na ledu. Reakční směs byla rozpipetována do 3 mikrozkušavek po 23 μl. Do prvních dvou byly přidány po 2 μl vzorků (CZ2682, CZ2813) a do třetí, která sloužila jako negativní kontrola stejné množství deionizované vody. Obsah

zkumavek byl po promíchání a centrifugaci vložen do termocyklu, kde probíhala PCR-reakce podle podmínek uvedených v Tab. 7.

Tab. 7: Přípravu reakční směsi pro PCR s primery P1/P7

Polohka	Koncentrace pracovního roztoku	Množství pro 1 test [μl]
Pufr	5 x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5
Voda		15
dNTP	2 mM	1
f primer	20 pmol/μl	0,3
r primer	20 pmol/μl	0,3
GO Taq pol	5 U/μl	0,2
celkem		23 μl
vzorek DNA		2 μl
Objem reakce		25 μl

Tab. 8: Podmínky PCR reakce s primery P1/P7

95 °C	3 min.	
95 °C	1 min.	} 35 cykl
55 °C	1 min.	
72 °C	3 min.	
72 °C	10 min.	

Získané PCR produkty byly 40x naředěny deionizovanou vodou byly použity jako templátová DNA v druhém PCR kroku, 'nested' PCR s pomocí univerzálních primer R16F2/R2 (viz Tab. 13). Byla připravena reakční směs pro 4 testy, která byla stejného složení jako PCR směs pro 'direct' PCR, lišila se pouze použitými primery R16F2/R2 (Tab. 7). Reakční směs byla rozpipetována po 23 μl do 4 mikrozkušavek. Do tří mikrozkušavek byly přidány 2 μl předních PCR-produktů P1/P7 a do čtvrté byla napipetována deionizovaná voda jako negativní kontrola.

4.2.2 Detekce produktů PCR pomocí gelové elektroforézy

PCR produkty 'direct' a 'nested' PCR byly detekovány za pomoci gelové elektroforézy. 1,5% agarózový gel byl připraven pozvolným rozvařením 0,75 g agarózy v 50 ml TAE pufru. Po mírném zchladnutí gelu do něj bylo přidáno 3,5 µl fluorescenčního barviva GelRed (Biotium) a gel byl nalit do připravené vaničky s dvěma hřebíčky umístěné v elektroforetické komoře. Gel tuhnul cca 30 minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí gelu byla komočka naplněna TAE pufrem, gel byl přešlazen cca 0,5 cm pufrem, byly vyjmuty hřebíčky a do vzniklých jamek pipetovány vzorky. Do prvních jamek obou stran byly napipetovány 2 µl standardu molekulové váhy (Gene Ruler, 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas). Do ostatních jamek byly postupně pipetovány vzorky, vždy 3 µl vzorku smíchané s 2 µl nanášečského pufru bromfenolové modři (0,1%). Elektroforetická separace probíhala cca 1 hodinu při napětí 80 V. Gel byl poté opláchnut destilovanou vodou a umístěn do UV transluminátoru, a pomocí dokumentačního zařízení (program GeneSnap) byly vizualizovány a dokumentovány získané PCR produkty.

4.3 Izolace PCR produktu

Na základě výsledků PCR-amplifikací vyhodnocených pomocí gelové elektroforetické separace byly určeny pozitivní PCR produkty, které byly následně klonovány. PCR produkty byly izolovány s pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) za dodržení postupu izolace navrženým výrobcem. Nejprve byla provedena elektroforetická separace PCR produktu. Byl použit 1% agarózový TAE gel s přísadkou 2 µl Etidium bromidu (10 mg/ml, 2 µl na 50 µl gelu) a napětí 80 V. Gel s rozdělenými vzorky byl umístěn na UV transluminátor a za procházejícího UV světla byly PCR produkty specifické velikosti sterilním skalpelem vyříznuty a umístěny do předem zvážených a označených 1,5 ml zkumavek Eppendorf. Zkumavky s gelem byly znovu zváženy a byla odečtena hmotnost gelu. Byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3 : 1 (tj. k navážce 100 ng, 300 µl QG pufru). Gel byl s pufrem inkubován při 50 °C v Dry-Block dokud nedojde k jeho úplnému rozpuštění a poté byl přidán 1 objem izopropanolu (tj. při navážce 100 mg 100 µl). Izolace DNA přes kolonku byla provedena podle následujících bodů :

1. Napipetování celého objemu sm si do kolonky (nejednou max. 700 µl)
2. Centrifugace 1 min p i 13 000 ot.
3. Odstranění proteklé kapaliny
4. P ídavek 500 µl QG pufru do kolonky
5. Centrifugace 1 min p i 13 000 ot.
6. Odstranění proteklé kapaliny
7. P ídavek 750 µl PE pufru do kolonky
8. Centrifugace 1 min p i 13 000 ot.
9. Umístění kolonky do nové 1,5 ml zkumavky
10. P ídavek 30 µl destilované vody
11. Centrifugace 1 min p i 13 000 ot.

4.4 Klonování PCR produktu

4.4.1 Ligace

Vyizolovaná DNA byla zakoncentrována vysušením ve vakuové odparce SpeedVac (Thermo Savant) a rozpuštěna v 10 µl deionizované vody. Ligační směs byla připravena s pomocí kitu pGEM-T Vector system (Promega) a její složení je uvedeno v Tab. 9. Ligace probíhala přes noc při 4 °C.

Tab. 9: Příprava ligační směsi, kit pGEM-T Vector system

Polofka	Objem [µl]
pGem-T ligační pufr	5
pGem-T plazmid	1
T4 DNA ligáza	1
vyizolovaný PCR produkt	3

4.4.2 Transformace bakterií *Escherichia coli*

Pro transformaci byly použity kompetitivní bakterie *E. coli*, kmen JM109, které byly připraveny pro transformaci teplotním šokem (tzv. heat shock) a byly dlouhodobě uchovávány v -80 °C. 75 µl suspenze kompetitivních bakterií bylo smícháno s 5 µl ligační směsí. Výsledná směs byla inkubována 20 min na ledu. Transformace byla provedena

teplotním blokem v Dry-Blocku při 42 °C po dobu 45 s. Pak byla bakteriální suspenze inkubována v ledu po dobu 2 min a poté bylo k suspenzi přidáno 850 µl SOC média a směs byla inkubována na teplotě v 37 °C po dobu 90 min. Po skonění inkubace byla směs zcentrifugována (3 min, 5 000 g) a byl odstraněn supernatant (cca 850 µl). Zbýlý sediment bakteriálních buněk byl rozsuspendován v 50 µl vody. Byly připraveny Petriho misky s LB médiem, do kterého byl přidán zásobní roztok ampicilinu (100 µg/µl), po ztuhnutí média bylo na povrch nanášeno 40 µl X-Gal a 4 µl induktoru IPTG. Bakteriální suspenze byla přenesena na LB médium a rozetena sterilními kličkami. Poté byly bakterie kultivovány přes noc, ve tmě, při teplotě 37 °C. Následující den byla vyhodnocena úspěšnost ligace a transformace.

4.5 Testování pozitivních kolonií

Bílé pozitivní kolonie byly pomocí sterilních bambusových párátek přeneseny na nové LB médium s ampicilinem a zároveň byly testovány PCR-reakcí s použitím primerů M13f/M13r (viz Tab. 13). Byla připravena reakční směs pro 7 testů, její složení je uvedeno v Tab. 10. Reakční směs byla rozpipetována do 7 zkumavek po 25 µl a do každé zkumavky byla přenesena 1 pozitivní kolonie, která byla přidána také přenesena na nové LB médium. Zkumavky byly dány do termocykleru, kde probíhala PCR amplifikace za podmínek uvedených v Tab. 11. Produkty této reakce byly rozděleny elektroforetickou separací na 1% agarózovém gelu. Podle výsledku PCR-reakce byly určeny pozitivní kolonie obsahující plazmid s vloženým produktem P1/P7. Bakterie byly přeneseny do 1 ml tekutého LB média s ampicilinem a kultivovány přes noc při 37 °C. Na druhý den z nich byly pracovníky laboratoře připraveny tzv. bakteriální konzervy, které mohou být využity pro pozdější práci se vzorky.

Tab. . 10: Příprava reakční směsi pro PCR s primery M13f/M13r

Polofka	Koncentrace pracovního roztoku	Množství pro 1 test [μ l]
pufř	5 x	5
MgCl ₂	25 mM	1,5
Voda		15,3
dNTP	2 mM	2,5
M13f primer	20 pmol/ μ l	0,25
M13r primer	20 pmol/ μ l	0,25
GoTaq pol	5 U/ μ l	0,2
Celkem		25
Objem reakce		25

Tab. . 11: Podmínky PCR reakce pro primery M13f/M13R

94°C	5 min.	
94°C	1 min.	} 35 cykl
55°C	2 min.	
72°C	3 min.	
72°C	10 min.	

4.6 Sekvencování

4.6.1 Izolace produktů PCR-reakce s primery M13f/M13r

Pozitivní produkty PCR reakce s primery M13f/M13r byly rozděleny elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu a na UV transluminátoru skalpelem z gelu vyříznuty. Izolace DNA byla provedena stejným způsobem jako při izolaci PCR produktu P1/P7 a byl použit stejný kit (QIAquick Extraction Kit, QIAGEN, Germany). Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na fluorometru (Hofer DyNa Quant 200).

4.6.2 Příprava sekvenční směsi

Sekvenční reakční směs byla připravena pomocí kitu Big Dye sequencing terminator (PE Biosystems, UK) pro 2 testy, její složení je uvedeno v Tab. 12. Podle mapy plazmidu pGem-T byla vypočítána velikost produktu na 2 237 bp. Velikost fragmentu, který byl použit jako templátová DNA byla tedy cca 1800 bp, což odpovídá 50 ng DNA do reakce. Při této délce fragmentu a zmíněné koncentraci DNA 12 a 13 ng/μl, bylo optimální množství DNA přidané do reakce 4 μl. Celkem bylo připraveno 6 reakčních směsí obsahujících vždy odlišný primer. Byly použity primery M1, R2, F2, RU3, M13R a M13r (viz Tab. 13). Reakční směs byla rozdělena do 2 mikrokumavek po 6 μl, ke kterým byly přidány vždy 4 μl vzorku. Vlastní sekvenování bylo provedeno na automatickém sekvenátoru ABI PRISM model 3730 (PE Applied Biosystems, USA) ve spolupráci s ÚEB AV ČR v Olomouci.

Tab. 12: Příprava reakční směsi pro sekvenování

Polofka	Množství pro 1 test [μl]
BigDye	1
pufř	1
primer (1,6 pmol/μl)	2
vzorek DNA	4
voda	2

4.7 Bioinformatické analýzy

Získané sekvence DNA fragmentů vyizolovaných z pcháň byly upraveny a složeny do výsledné sekvence pomocí programu SeqMan (DNASTAR, Lasergene). Tyto sekvence byly analýzou BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) porovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank a iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>). Na základě těchto analýz byly fytoplazmy identifikovány. Získané sekvence byly seřazeny se sekvencemi vybraných izolátů fytoplazem skupin 16SrXI, 16SrXIV a fylogeneticky příbuzných nezařazených fytoplazem získaných z databáze GenBank. Pomocí programu ClustalW byl sestaven mnohoetný alignment. Pomocí programu MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 5) metodou neighbor-joining byla provedena fylogenetická analýza a byl vytvořen fylogenetický strom.

4.8 Použití roztoky a přístrojové vybavení

V experimentální části bakalářské práce bylo použito mnoho roztoků, primerů a jiných chemikálií, jejichž seznam, popř. příprava jsou uvedeny v tabulkách 13, 14 a 15. Přehled přístrojového vybavení laboratoře, se kterým bylo pracováno, je uveden v Tab. 16.

Tab. 13: Seznam použitých primerů

Označení	Sekvence 5'→3'	Autoři	Velikost produktu
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng a Hiruki, 1991	1 800 bp
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Schneider <i>et al.</i> , 1995	
R16F2	ACGACTGCTAAGACTGG	Lee <i>et al.</i> , 1995	1 200 bp
R16R2	TGACGGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Lee <i>et al.</i> , 1993	
M13f	GTAAAACGACGGCCAG	Messing, 1983	
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing, 1983	
M1	GTCTTTACTGACGCTAGGC	Gibb <i>et al.</i> , 1995	
rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Lorenz <i>et al.</i> , 1995	

Tab. 14: Seznam použitých chemikálií

Použití	Chemikálie
PCR-reakce	deionizovaná voda
	dNTP (Promega)
	Go Taq™ DNA polymeráza (Promega)
ELFO	Agaróza (Biotechnology Crade, Amresco)
	TAE pufr (složený viz příloha)
	fluorescenční barvivo GelRed™ (10 000x v DMSO, Biotium)
	Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)
	0,1% roztok bromfenolové modři v 30% glycerolu
Izolace DNA z gelu	QIAquick ^R Qiagen Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Pokračování str. 33

Pokračování Tab. . 14

Použití	Chemikálie
Transformace	pGem-T ^R Vector System (Promega)
	SOC médium (složený viz příloha)
	LB médium (příprava viz tab. . 17)
	zásobní roztok ampicilinu (100 µg/µl, Sigma-Aldrich)
	zásobní roztok X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (20 mg/ml, rozpuštěn v dimethylformamidu)
	zásobní roztok IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (200 mg/ml, rozpuštěn v destilované vodě)
Sekvenace	Big Dye sequencing terminator kit (PE Biosystems)

Tab. . 15: Příprava LB média

Složka	Množství na 250 ml (tuhé médium)
Kasein hydrolyzát	2,5 g
Kvasničný autolyzát	1,25 g
Pepton	1,25 g
NaCl	2,5 g
H ₂ O	250 ml
Agar	18 g

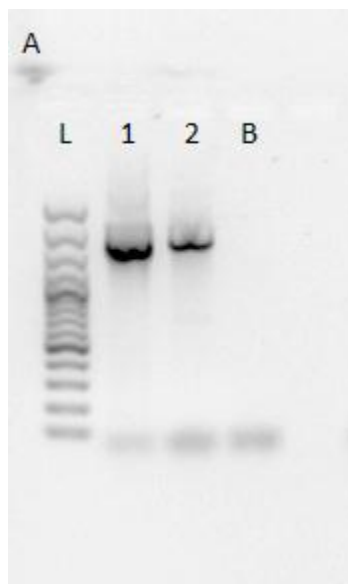
Tab. . 16: Přístrojové vybavení laboratoře

Přístroj	Firma
centrifuga Jouan MR 22i	
centrifuga MLW K 23 D	
Dri-block R DB 2D	Techne
Power pack P25	Biometra
Flowbox PV-100	Telstar
Fluorometr Hoefer DyNa Quant 200	
hlubokomrazicí box MDF-U52V	Sanyo
Biologický termostat	
Minicentrifuga Spectrafuge mini 25D	
Nanodrop ND - 1000 (V.3.7.0)	Thermo Scientific
PCR cykler T-personal	Biofuge
SPD SpeedVac SPD111V	Thermo Savant
UV transluminátor G-box s programem GeneSnap	Syngene
Vortex MS1 Minishaker	IKA

5 VÝSLEDKY

Z obou vzorků DNA izolovaných z infikovaných rostlin pchá e osetu byl pomocí PCR reakce s univerzálními primery P1/P7 získán produkt o očekávané velikosti cca 1800 bp (Obr. . 6). V kontrolní reakci s vodou nebyl získán žádný produkt.

Obr. . 6: Produkty PCR s primery P1/P7



L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas);
dráha 1: CZ2682; dráha 2: CZ2813; B: blank.

PCR produkty P1/P7 byly úspěšně vyizolovány z gelu. Pro ověření izolace byl výsledný produkt rozdlen elektroforetickou separací, která potvrdila úspěšnost izolace (Obr. . 7).

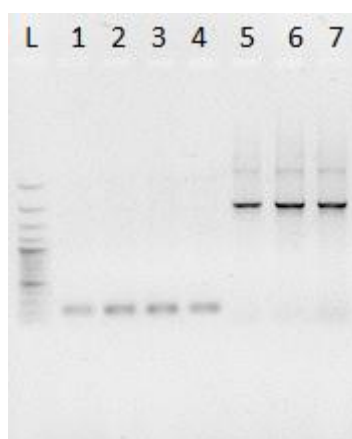
Obr. . 7: Izolovaný produkt P1/P7



Obr. . 7: L : standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas)
dráha 1: vzorek CZ2682; dráha 2: vzorek CZ2813

Byly získány transformované bakterie *E. coli* nesoucí pGem-T plazmid s ligovaným segmentem P1/P7. Pozitivní kolonie, u kterých byla transformace úspěšná byly bílé. Na miskách s oběma vzorky bylo celkem 7 pozitivních kolonií. Úspěšnost transformace byla testována také PCR-amplifikací s primery M13f/M13r (Obr. 8). U 3 kolonií byla potvrzena přítomnost inzertu, u všech 3 se jednalo o vzorek CZ2813. U vzorku CZ2682, který byl při testování kolonií PCR amplifikací negativní, byla provedena opakovaná ligace a transformace a vzorek byl osekvenován společně se vzorkem CZ2813.

Obr. 8: Testování kolonií pomocí PCR reakce s primery M13f/M13r



L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas);
dráha 1,2,3,4 - kolonie vzorku 2682; dráhy 5,6,7- kolonie vzorku 2813

Složením sekvencí izolátu CZ2682 byla získána sekvence o délce 1806 bp. Složením sekvencí izolátu CZ2813 byla získána sekvence o délce 1806 bp, která se od sekvence CZ2682 lišila v pozicích 742 (T místo A) a 1632 (A místo T). Identita sekvencí byla ověřena pomocí BLAST analýzy, obě sekvence vykazovaly stejné výsledky. Výsledky analýzy BLAST jsou uvedeny v Tab. 17. Sekvence izolát CZ2682 a CZ2813 vykazovaly nejvyšší identitu, a to 99% s izolátem CirP (X83438.1), který byl detekován v pchání a není zařazen do žádné 16Sr skupiny fytoplazem. Dále vykazovaly identitu 96 % s izoláty GaLL (Y15865.1) a BVK (HQ589192.1). Srovnáním sekvencí izolátů Bermuda grass white leaf fytoplazmou byly sekvence obou izolátů hodnoty maximální identity 95 % (AF248961.1, AJ550984.1), což není dostatečné pro prokázání identity s BGWL izoláty (*Candidatus* Phytoplasma cynodontis). Podle iPhyClassifier obě fytoplazmy, CZ2682 a CZ2813, srovnáním sekvencí F2/R2 (1200 bp) vykazují podobnost nižší než 97,5 % s jakýmkoliv dříve definovaným druhem fytoplazem, a tedy tyto izoláty nemohou být přiřazeny k žádnému z popsaných

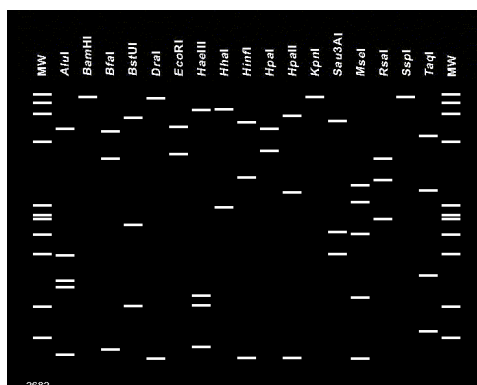
druh fytoplazem. Získané sekvence sdílí nejvíce podobnost se sekvencí fytoplazmy Bermuda grass white leaf (AJ550984). Podobnost sekvence 16S rDNA izolátu CZ2682 a BGWL fytoplazmy byla 96,6 % a u CZ2813 96,5 %. Podle pravidel IRPCM (2004) mohou naše izoláty fytoplazem představit nový druh v rámci *Candidatus* phytoplasma.

Tab. 17: BLAST analýza složených sekvencí vzorků 2682 a 2813

Accession number	Popis	Query coverage	Max ident
X83438.1	Mollicutes sp., strain CirP	97%	99%
Y15865.1	Phytoplasma sp., strain GaLL	98%	96%
HQ589192.1	Psammotettix cephalotes' flower stunt phytoplasma, strain BVK	97%	96%
AF248961.1	Bermuda grass white leaf phytoplasma	99%	95%
AB642601.1	Golden beard grass white leaf phytoplasma	99%	95%
EU294011.1	Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma	99%	95%
AB646271.1	Sugarcane white leaf phytoplasma	96%	95%
AJ550984.1	Bermuda grass white leaf phytoplasma, isolate BGWL-C1	97%	95%

Pomocí iPhyClassifier byly také provedeny virtuální RFLP analýzy 16S rDNA, fragmentu F2/R2, obou fytoplazem. Měly stejné restriční profily (Obr. 9), které se lišily od profilů všech známých skupin. Nejvíce byly tyto profily podobné skupině Rice yellow dwarf (16SrXI), podskupině A (AB052873), můžeme představit novou skupinu.

Obr. 9: Virtuální RFLP analýza fytoplazem detekovaných v pšeni, vzorky 2682 a 2813 (iPhyClassifier, <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>)

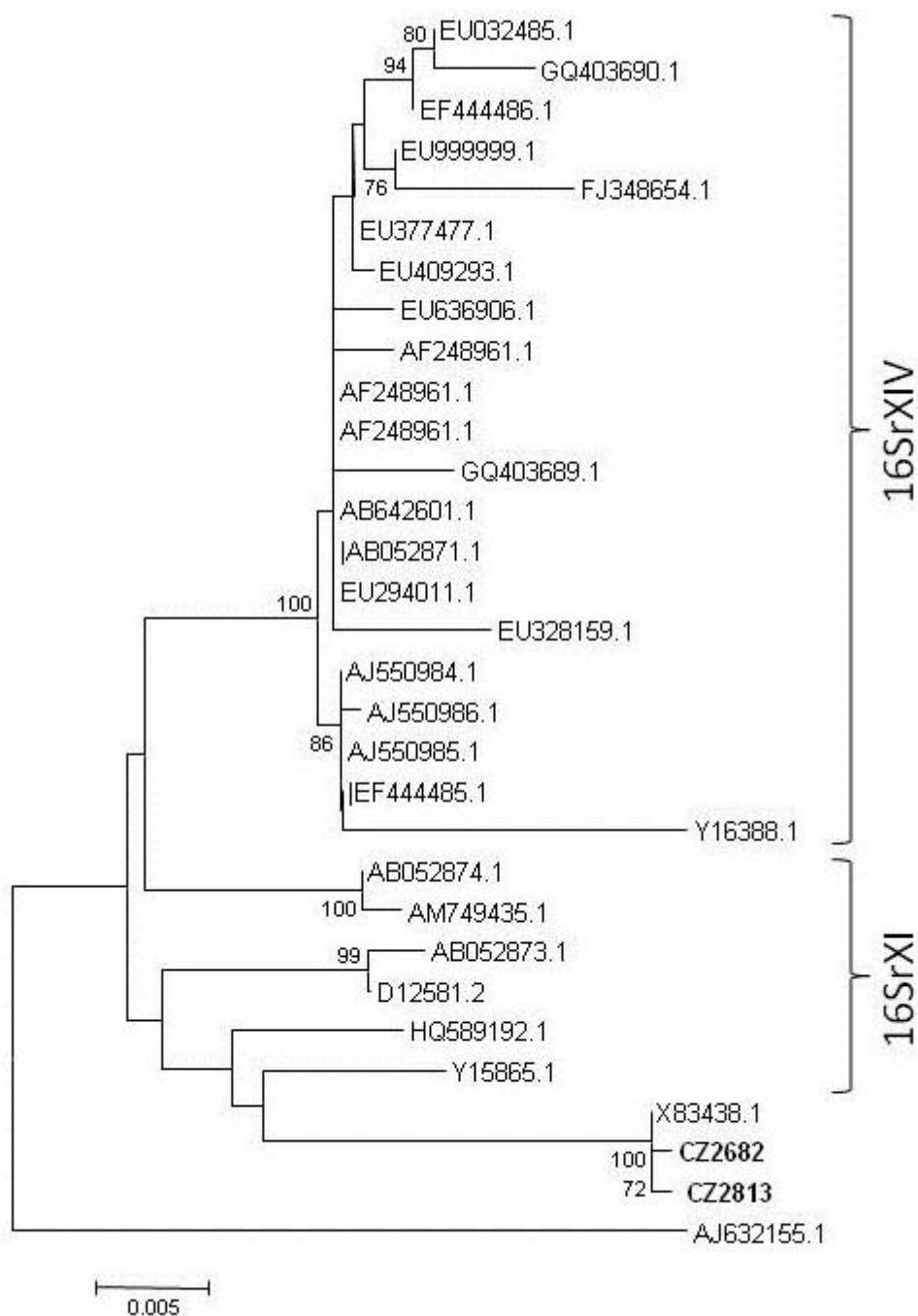


Sekvence studovaných izolát CZ2682 a CZ2813, byly mnoho etným aligmentem se azeny se sekvencemi získanými z databáze, které jsou uvedeny v Tab. . 18. Jejich fylogenetická p říbuznost byla stanovena metodou neighbor-joining a znázor ůje ji dendrogram (Obr. . 10).

Tab. . 18: Izoláty fytoplazem skupiny 16SrXIV porovnané fylogenetickou analýzou ze sekvencemi izolát CZ2682 a CZ2813 (GenBank)

Druh fytoplazmy	Acc. No.	16Sr skupina
Coconut yellow decline phytoplasma (CYD)	EU328159	16SrXIV
Coconut yellow decline phytoplasma (CYD)	EU636906	16SrXIV
Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma	EU294011	16SrXIV
Cynodon white leaf phytoplasma (CWL)	AF509321	16SrXIV
Firoozabad Bermuda grass white leaf phytoplasma (FBGWL)	EF444485	16SrXIV
Juyom Bermuda grass white leaf phytoplasma (JBGWL)	EF444486	16SrXIV
Bermuda grass white leaf phytoplasma (BGWL)	AB052871	16SrXIV
	AF248961	16SrXIV
	AJ550984	16SrXIV
	AJ550985	16SrXIV
	AJ550986	16SrXIV
	EU032485	16SrXIV
	EU377477	16SrXIV
	EU409293	16SrXIV
	EU999999	16SrXIV
	FJ348654	16SrXIV
	GQ403690	16SrXIV
	GQ403689	16SrXIV
	Y16388	16SrXIV
Mollicutes sp, strain Cirp	X83438.1	neza azeno
Phytoplasma sp., strain Gall	Y15865.1	neza azeno
Psammotettix cephalotes' flower stunt phytoplasma strain BVK	HQ589192.1	16SrXI
Sugarcane grassy shoot phytoplasma	AM749435.1	neza azeno
Sugarcane white leaf phytoplasma	AB052874.1	16SrXI
Candidatus Phytoplasma oryzae	AB052873.1	16SrXI
Candidatus Phytoplasma oryzae	D12581.2	16SrXI

Obr. . 10: Dendrogram vyjadřující fylogenetické vztahy izolátů fytoplazem CZ2682, CZ2813 a fytoplazem skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV) a Rice yellow dwarf (16SrXI)



Obr. . 10: Dendrogram sestavený pomocí neighbor-joining analýzy, jednotlivé analýzy jsou označeny příslušným Acc.No. Úsečka znázorňuje procento substitucí, jsou znázorněny hodnoty bootstrap v třídě 70. Jako outgroup je zařazen *Candidatus Phytoplasma pini* (AJ632155.1)

Fylogenetická analýza nepotvrdila příslušnost izolátů CZ2682 a CZ2813 do skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV). Sekvence tvořící spolek se sekvencí izolátu CirP (X83434) jsou rozlišitelnou větvičkou, která vykazuje blízkou příbuznost s izoláty skupiny Rice yellow dwarf (16SrXI), které se od 16SrXIV prokazatelně liší. Fylogenetická analýza, stejně jako iPhyClassifier analýza naznačuje, že se může jednat o nový druh fytoplazmy.

6 DISKUZE

Byly analyzovány dva izoláty fytoplazem CZ2813 a CZ2682 z rostlin pchá e osetu z oblasti jiří Moravy. Rostliny p i odb ru materiálu vykazovaly chlorózu a proliferaci, p íznaky typické pro fytoplazmální infekci. Z vyizolované DNA byl získán PCR produkt P1/P7 reprezentující 16S rDNA gen, který byl po namnoení sekvenován a podle sekvencí byly fytoplazmy identifikovány. P edb flná analýza t chto izolát nazna ıla, že se jedná o fytoplazmy skupiny Bermuda grass white leaf (16SrXIV), ale jejich za azení nebylo jednozna n potvrzeno (Flídr, 2010).

První zprávu o výskytu fytoplazmy BGWL v Evrop publikovali Marcone *et al.* (1997), jednalo se o nálezy z oblasti jiří Itálie. Jejím hlavním hostitelem je troskut prstnatý, který pat í mezi plevele, proto z ejm není této fytoplazm v nována taková pozornost a nebyly nalezeny informace o jejím výskytu na jiných územích Evropy. O jejím výskytu v R není zatím publikována fládná zpráva. Sneider *et al.* (1997) uvádí mořnost výskytu fytoplazem blízkých fytoplazm BGWL v rostlinách pchá e. Sekvencováním 16SrDNA genu izolát CZ2682 a CZ2813 byly získány dv tém totořné sekvence. Fytoplazmy sdílely s fytoplazmou Bermuda grass white leaf (Acc. No. AJ550984) 95% identitu nukleotidových sekvencí, což není dosta ující pro jednozna nou identifikaci fytoplazmy. Fytoplazmy byly z 99 % identické se zástupcem t ídy *Mollicutes*, izolátem CirP (X83438.1), který byl rovn í vyizolován z pchá e, ale nebyl blíže taxonomicky za azen. Pro získání dal-ích výsledk byly sekvence analyzovány programem pro taxonomii fytoplazem iPhyClassifier. Fytoplazmy nesdílely s fládným jiří existujícím druhem fytoplazmy podobnost sekvence 16S rDNA (F2/R2) v t-í neř 97,6 %, což je podle IRPCM doporu ená hranice pro definování druhu. Nejv t-í podobnost sdílely s fytoplazmou BGWL (AJ550984) a to více neř 96,5 %. Podle pravidel IPRCM (2004) definujících fytoplazmový druh se m že jednat o nový druh v rámci *Candidatus* phytoplasma, což je podpo eno také výsledkem analýzy BLAST. Analýzou RFLP, která byla provedena *in silico*, vznikly restrikní profily nejvíce podobné skupin Rice yellow dwarf 16SrXI, výsledek v-ak také nazna oval, že se m že jednat o novou skupinu. Pomocí metody neighbor-joining byla provedena fytořenetická analýza sekvencí 16S rDNA izolát CZ2682, CZ2813, CirP, GaLL a vybraných izolát fytoplazem skupiny Bermuda grass white leaf a Rice yellow dwarf získaných z databáze NCBI. Fytoplazmy skupiny Bermuda grass white leaf tvo í z eteln odli-nou v tev od skupiny Rice yellow dwarf. Tato analýza také potvrdila nejv t-í podobnost s izolátem CirP, se kterým izoláty CZ2682 a CZ2813 tvo í

z eteln odd lenou v tev, která je nejvíce p íbuzná skupin Rice yellow dwarf, do které je izolát CirP podle n kterých autor ázen (Jung *et al.*, 2003). N které nov j-í lánky ho v-ak z této v tve jasn vylu ují (Rao *et al.*, 2007). Pro zji-t ní, zda jsou izoláty CZ2682 a CZ2813 leny skupiny Rice yellow dwarf, nebo zda se jedná o novou skupinu, jsou nutné analýzy dal-ích, neribozomálních gen a prohloubení poznatk o biologii studovaných fytoplazem nap . okruh hostitel , vektor, geografické roz-í ení.

7 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše zaměřená na problematiku genetické variability fytoplazem ze skupiny Bermuda white leaf (16SrXIV).

Cílem experimentální části předložené bakalářské práce byla identifikace fytoplazem izolovaných z rostlin *Cirsium arvense*, rostoucích na jižní Moravě. Analýzou sekvencí 16S rDNA (F2/R2) získaných izolátů CZ2682 a CZ2813 pomocí taxonomického programu iPhyClassifier se izoláty CZ2682 a CZ2813 nedají jednoznačně přiřadit k žádnému popsanému druhu fytoplazmy, sekvenční se podobají fytoplazmám skupiny 16SrXIV. Virtuální analýzou RFLP fragmentu F2/R2 sekvencí vznikly restriční profily, které neodpovídaly žádné skupině fytoplazem, nejvíce podobnost vykazovaly s restričními profily fytoplazem ze skupiny Rice yellow dwarf (16SrXI). Fylogenetická analýza metodou neighbor-joining ukázala, že izoláty CZ2682 a CZ2813 tvoří zřejmě odlišnou větev společně s izolátem CirP (X83438.1). Tato větev je nejvíce příbuzná fytoplazmám skupiny 16SrXI. Molekulárně genetickou analýzou sekvencí 16S rDNA není možné přiřadit studované izoláty jednoznačně k žádné skupině nebo již popsanému druhu fytoplazem. Je tedy možné, že se jedná o nový druh fytoplazmy. Pro potvrzení této skutečnosti je nutné analyzovat variabilitu dalších, neribozomálních genů.

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.

Bai, X., Zhang, J., Holford, I. R., Hogenhout, S. A. (2004): Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. *FEMS Microbiology Letters* 235: 249-258.

Bai, X. D., Zhang, J. H., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., Hogenhout, S. A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682-3696.

Bertaccini, A. (2007): Phytoplasma: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.

Biabani, R., Ghasemi, S. (2011): Serological Aspects of Phytoplasma Associated with Bermuda grass White Leaf (BGWL) Disease. 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal. *IPCBE* 13: 106-110.

Blanche, K. R., Tran-Nguyen, L. T. T., Gibb, K. S. (2003): Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northern Australia. *Plant Pathology* 52: 505-512.

Cronjé, P., Dabek, A. J., Jones, P., Tymon, A. M. (2000a): Slow decline: a new disease of mature date palms in North Africa associated with a phytoplasma. *Plant Pathology* 49: 804.

Cronjé, P., Dabek, A. J., Jones, P., Tymon, A. M. (2000b): First report of a phytoplasma associated with a disease of date palms in North Africa. *Plant Pathology* 49: 801.

Dafalla, G. A., Cousin, M. T. (1988): Fluorescence and electron microscopy of *Cynodon dactylon* affected with a white leaf disease in Sudan. *Journal of Phytopathology* 122: 25-34.

Davis, M. J., Lawson, R. H., Gillaspie, A. G., Harris, R. W. (1983): Properties and relationships of two xylem-limited bacteria and a mycoplasma-like organism infecting Bermuda grass. *Phytopathology* 73: 341-346.

Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.

Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J.-L., Mřárová, D., Foissac, X., Navrátil, M. (2009): Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south moravia. *Journal of Plant Pathology* 91: 411-416.

Flídr, P. (2010): Výskyt a molekulární charakteristika fytoplazem vyvolávajících floutenku pchá e (*Cirsium arvense*). P írodov decká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Fránová, J. (2008): Metody detekce fytoplazmový onemocnění. In: Navrátil M., Fialová R. (eds.): Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 35.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.

Jung, H.Y., 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 phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1925-1929.

Kollar, A., Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 141: 395-401.

Kubát, K. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.

Kubát, K. (2006): Systém a fylogeneze vyšších rostlin. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta, Katedra biologie.

Lee, I. M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D. E. (1995): Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.

Lee, I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000): Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.

Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertaccini, A. (1998): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.

Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Lee, I. M., Pastore, M., Vibio, M., Danielli, A., Attathom, S., Davis, R. E., Bertaccini, A. (1997): Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *European Journal of Plant Pathology* 103: 251-254.

Lim, P. O., Sears, B. B. (1991): DNA sequence of the ribosomal protein genes *rp12* and *rps19* from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiology Letters* 84: 71-73.

Lim, P. O., Sears, B. B., Klomparens, K. L. (1992): Membrane properties of a plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Journal of Bacteriology* 174: 682-686.

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., Ragozzino, A., Seemüller, E. (1997): Detection of Bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis. *Plant Disease* 81: 862-866.

Marcone, C., Schneider, B., Seemüller, E. (2004): *Candidatus* Phytoplasma cynodontisø the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 107761082.

Nakashima, K., Hayashi, T., Chaleeprom, W., Wongkaew, P., Sirithorn, P. (1996): Complex phytoplasma flora in Northeast Thailand as revealed by 16S rDNA analysis. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 62: 57-60.

Navrátil, M., Válková, P. (2008): Fytoplazmy - obligátní intrabun éné patogeny. In: Navrátil M., Fialová R. (eds.): Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. eská fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 19.

Navrátil, M., Válková, P. (2008): Fytoplazmy jako karanténní patogeny. In: Navrátil M., Fialová R. (eds.): Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. eská fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 48.

Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S. N. A., Vadamalai, G., Dickinson, M. (2009): Phytoplasmas associated with disease of coconut in Malaysia: phylogenetic groups and host plant species. *Plant Pathology* 58: 115261160.

Obura, E., Masiga, D., Midega, C. A. O., Wachira, F., Pickett, J. A., Deng, A. L., Khan, Z. R. (2010): First report of a phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease in Kenya. *New Disease Reports* 21: 23.

Rao, G. P., Mall, S., Singh, M., Marcone, C. (2009): First report of a *Candidatus* Phytoplasma cynodontisø-related strain (group 16SrXIV) associated with white leaf disease of *Dichanthium annulatum* in India. *Australasian Plant Disease Notes* 4: 56658.

Rao, G. P., Mall, S., Marcone, C. (2010): *Candidatus* Phytoplasma cynodontisø (16SrXIV group) affecting *Oplismenus burmannii* (Retz.) P. Beauv. and *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. in India. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 93695.

Rao, G. P., Raj, S. K., Snehi, S. K., Mall, S., Singh, M., Marcone, C. (2007): Molecular evidence for the presence of *Candidatus* Phytoplasma cynodontisø the Bermuda grass white leaf agent, in India. *Bulletin of Insectology* 60: 145-146.

Rao, G. P., Srivastava, S., Singh, M., Marcone, C. (2007): Phylogenetic relationships of sugarcane grassy shoot phytoplasma with closely related agents, *Bulletin of Insectology* 60: 347-348.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin M. T., Seemüller, E. (1997): Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 675-686.

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.

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., Namba, S. (2005): Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 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.

Tran-Nguyen, L., Blanche K. R., Egan, B., Gibb, K. S. (2000): Diversity of phytoplasmas in northern Australian sugarcane and other grasses. *Plant Pathology* 49: 666-679.

Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., Zhao, Y. (2007): Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.

Zahoor, A., Bashir, M., Nakashima, K., Mitsueda, T., Murata, N. (1995): Bermuda grass white leaf caused by phytoplasmas in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 27: 251-252.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Anglicky (eský výraz)
ABGWL	Annual blue grass white leaf phytoplazma
Acc. No.	Accession number (identifika ní íslo sekvencí v GenBank)
Amp	Antigen membrane protein (antigenní membránový protein)
BGWL	Bermuda grass white leaf phytoplasma
bp	base pairs (páry bazí)
BraWL	Brachiaria white leaf phytoplasma
CTAB	cetyl trimethyl amonium bromid
CWL	Cynodon white leaf phytoplasma
CYD	Coconut yellow decline phytoplasma
DACWL	Dactyloctenium white leaf phytoplasma
DAPI	fluorochrom 466- diamidino626fenylindol . 2 HCl
DIBA	dot immunobindig assay
DNA	Deoxyribonukleotid acid (deoxyribonukleová kyselina)
IPTG	isopropyl- -D-thiogalactopyranoside
IRPCM	International Research Programme on Comparative Mycopathology
LB	Luria-Bertani (médium)
MLOs	Mycoplasma like organisms (organismy podobné mykoplazmám)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová et zová reakce)
PMUs	Potential mobility units (potenciální mobilní jednotky)
PTA-ELISA	Plate-Trapped Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polymorfismus délky restrik níh fragment)
TAE	Tris acetate EDTA buffer (Tris-acetátový EDTA pufr)
WTD	White tip die-back phytoplasma

10 P ÍLOHY

Slofení pouffitých roztoků a p íprava médií

SOC médium pro p-GEM-T kit

Pepton	2 g
Kvasni ný extrakt	0,5 g
1M	
NaCl	1 ml
1M KCl	0,25 ml
2M roztok Mg ²⁺	1 ml
2M glukóza	1 ml

Mg²⁺ roztok:

MgCl ₂ .6 H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	24,65 g

Doplnit do 100 ml

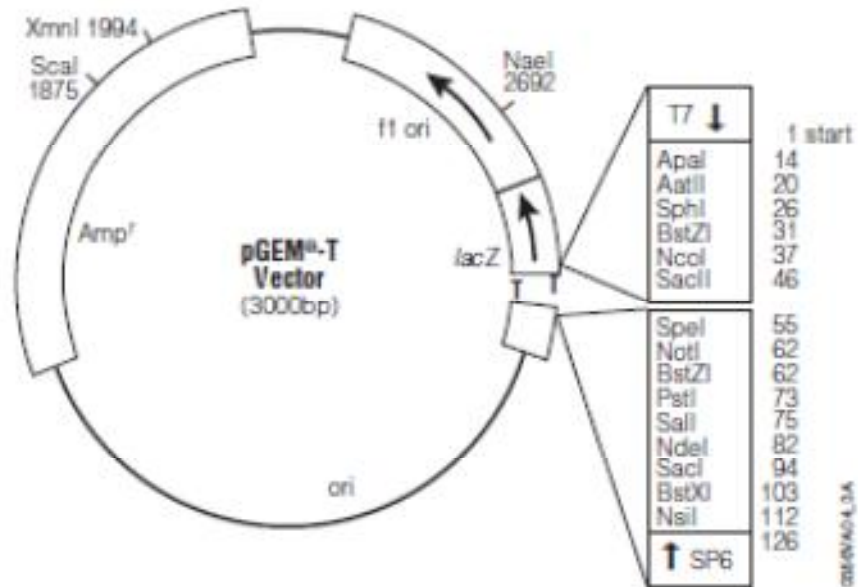
Pepton, kvasni ný extrakt, NaCl a KCl rozpustíme v 97 ml vody, autoklávueme a po zchládnutí na pokojovou teplotu p idáme roztok Mg²⁺ a glukózu a doplníme sterilní vodou do 100 ml.

TAE pufr (1l , 50x zásobní roztok)

TRIS base	242 g
Kyselina octová	57,1 ml
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	37,2 g

Doplníme vodou do 1l.

10.2 MAPA PLAZMIDU p-GEM-T (Promega)



pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage <i>f1</i> region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

