

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Identifikace genotypů fytoplazmy '*Candidatus*
Phytoplasma mali', původce onemocnění
proliferace jabloně za použití genu Imp

Bakalářská práce

Autor: Josef Podlipný
Studijní program: B1501
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, z kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Děkuji RNDr. Markétě Bohunické, Ph.D. za její ochotu a čas, který mi při vedení bakalářské práce věnovala, za její odborné rady, pomoc při práci v laboratoři a uvedení do celé problematiky. Také bych rád poděkoval Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy s.r.o. za poskytnutí vzorků a možnost pracovat v laboratořích Laboratorního komplementu. Rád bych poděkoval i personálu Laboratorního komplementu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o., zejména RNDr. Radku Čmejlovi, Ph.D., Mgr. Lucii Valentové a Ing. Martině Rejlové za jejich praktické připomínky a pomoc v laboratoři.

Anotace

PODLIPNÝ, J. *Identifikace genotypů fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali', původce onemocnění proliferace jabloně za použití genu imp*. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Markéta Bohunická. 48 s.

Bakalářská práce se zabývá genetickou variabilitou fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' za použití genu *Imp* kódujícího imunodominantní membránový protein. Práce zahrnuje krátké úvodní shrnutí problematiky detekce a výzkumu fytoplazem v rostlinách se zaměřením na ovocné dřeviny a zejména pak hospodářsky velmi významné jabloně (*Malus* Mill.). Nejdůležitějším bodem praktické části bakalářské práce je popsání jednotlivých genotypů fytoplazmy proliferace jabloně na základě genu *Imp* v testovaných rostlinách. Gen byl amplifikován z již izolované DNA, která byla dodána Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o a z osmi odebraných vzorků. Při práci bylo zjištěno, že variabilita genu *Imp* fytoplazmy proliferace jabloně se pohybuje v rozmezí od 89,7 % do 99,7 %. Pomocí tohoto genu bylo získáno celkem 5 různých genotypů fytoplazmy proliferace jabloně, z nichž jeden byl v rámci Evropy již vyhodnocen jako silně virulentní. Na základě symptomů nelze určit konkrétní typ fytoplazmy proliferace jabloně, nelze určit ani zda je strom vůbec napadený. Výsledky jsou součástí širšího výzkumu, probíhajícího ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o.

Klíčová slova

fytoplazma, *Imp*, '*Candidatus Phytoplasma mali*', real-time PCR

Annotation

PODLIPNÝ, J. *Identification of 'Candidatus Phytoplasma mali' phytoplasma genotypes, the causal agent of apple proliferation using imp gene.* Hradec Králové, 2019. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Markéta Bohunická. 48 s.

This bachelor thesis deals with the genetic variability of phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*' using an *Imp* gene encoding an immunodominant membrane protein. The work includes a brief introductory summary of phytoplasma detection and research in plants focusing on fruit trees and mainly on apple trees (*Malus* Mill.). The most important point of the practical part of the bachelor thesis is the description of the individual genotypes of the phytoplasma of apple proliferation based on the *Imp* gene in the tested plants. The *Imp* gene was amplified from already isolated DNA, which was supplied by the research facility called *Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd.* and from another eight samples. It has been found that the variability of the *Imp* gene from '*Candidatus Phytoplasma mali*' ranges from 89.7% to 99.7%. Using sequence of this gene, a total of 5 different genotypes of '*Candidatus Phytoplasma mali*' were obtained, one of which was already diagnosed as highly virulent in Europe. Based on the symptoms, there is no possibility to determine the specific type of '*Candidatus Phytoplasma mali*', nor is it possible to determine whether the tree is attacked at all. The results are part of a broader research conducted at the *Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy Ltd.*

Keywords

phytoplasma, *Imp*, '*Candidatus Phytoplasma mali*', real-time PCR

Obsah

Úvod	8
1 Přehled dosavadních poznatků o problematice	9
1.1 Fytoplazma	9
1.2 Imunodominantní membránové proteiny (IDPs).....	9
1.2.1 Genomická organizace	10
1.2.2 Rekombinantní imunodominantní membránové proteiny.....	10
1.2.3 Struktura proteinů	10
1.3 Fytoplazma proliferace jabloně (' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ')	11
1.3.1 Proliferace jabloně	11
1.3.2 Symptomy proliferace jabloně	12
1.3.3 Detekce	13
1.3.4 Ochranná opatření	14
1.4 Přenašeči.....	14
1.4.1 Přenos roubováním	14
1.4.2 Hmyzí přenašeči.....	15
1.4.3 <i>C. picta</i> a <i>C. melanoneura</i> , přenašeči ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	15
2 Materiály a metodika.....	17
2.1 Materiál.....	17
2.2 Sběr vzorků.....	17
2.3 Přístrojové vybavení	19
2.4 Izolace DNA.....	20
2.4.1 Potřebné nástroje a reagentie.....	20
2.4.2 Postup izolace DNA.....	21
2.5 Real-time PCR analýza.....	22
2.5.1 Potřebné nástroje a reagentie.....	22
2.5.2 Postup real-time PCR.....	23
2.6 Amplifikace genu Imp.....	24
2.6.1 Potřebné nástroje a reagentie.....	24
2.6.2 Postup amplifikace genu Imp.....	24
2.7 Gelová elektroforéza	25
2.7.1 Potřebné nástroje a reagentie.....	25
2.7.2 Postup gelové elektroforézy.....	25
2.8 Purifikace DNA fragmentů z gelu.....	26
2.8.1 Potřebné nástroje a reagentie.....	26

2.8.2	Postup purifikace DNA fragmentů z gelu	26
2.9	Sekvenační reakce.....	27
2.9.1	Potřebné nástroje a reagensy.....	27
2.9.2	Postup sekvenační reakce	27
2.10	Fylogenetický strom.....	28
2.11	Variabilita genu Imp.....	29
3	Výsledky.....	30
3.1	Detekce fytoplazem 16SrX skupiny	30
3.2	Gelová elektroforéza	34
3.3	Analýza sekvencí.....	35
3.3.1	Variabilita genu Imp.....	39
3.3.2	Fylogenetický strom.....	39
3.3.3	Geografické rozšíření.....	41
3.3.4	Příznaky onemocnění.....	41
4	Diskuze	43
5	Závěr	46
	Seznam použité literatury	47

Úvod

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem fytoplazmy proliferace jabloně. Fytoplazma proliferace jabloně je prokaryotní organismus parazitující v sítkovicích lýka, který je znám již od počátku minulého století a je rozšířen téměř po celé Evropě. Jedná se o bakterii bez buněčné stěny, která se do svého rostlinného hostitele dostává pomocí hmyzího přenašeče, popřípadě vegetativním množáním rostlin. Bakterie svému hostiteli odebírá metabolity a ucpává vodivá pletiva, to vede k projevu infekce prostřednictvím řady specifických i nespecifických symptomů. Mezi nejvýraznější specifické symptomy patří metlovitost a zvětšení palistů. Fytoplazma proliferace jabloně má však negativní vliv i na plody rostlin. Plody hostitelských rostlin jsou výrazně menší, lehčí, mají nižší obsah cukrů a kyselin a stávají se tak neprodejnými. Tato choroba tak způsobuje značné ekonomické škody ve všech státech Evropy, pěstujících jabloně.

Fytoplazma proliferace jabloně má na povrchu své buněčné membrány imunodominantní membránový protein, který představuje většinu mezi povrchovými proteiny buněčné membrány. Imunodominantní membránový protein je v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky, jelikož se jedná o bakterii bez buněčné stěny. Proto se předpokládá, že tento protein hraje významnou roli v komunikaci mezi bakterií a hostitelem. Imunodominantní membránový protein je taky velice variabilní a je tedy ideálním rozlišovacím znakem jednotlivých genotypů fytoplazem.

Cílem praktické části bakalářské práce je identifikace získaných vzorků fytoplazmy proliferace jabloně pomocí sekvence nukleotidů genu pro imunodominantní membránový protein (Imp), přiřadit k jednotlivým genotypům fytoplazmy proliferace jabloně pozorované příznaky onemocnění a vyhodnotit jejich geografickou distribuci. Teoretická část práce bude obsahovat všechny aktuálně dostupné informace týkající se studované problematiky. Práce je součástí širšího výzkumu fytoplazem ovocných dřevin podpořeného Ministerstvem zemědělství (projekt QJ1510352).

1 Přehled dosavadních poznatků o problematice

1.1 Fytoplazma

Fytoplazmy se řadí do domény Bakterie, kmene Tenericutes, třídy Mollicutes, řádu Acholeplasmatales, čeledi Acholeplasmataceae, rodu *Candidatus Phytoplasma* a patří v Evropské unii mezi regulované škodlivé organismy (Bohunická et al., 2018). Tyto patogenní prokaryotické organismy bez buněčné stěny parazitují v cévních svazcích rostlin, konkrétně v sítkovicích lýka, do kterých se dostávají prostřednictvím svého hmyzího přenašeče, živícího se rostlinnými šťávami (Bohunická et al., 2018). Jejich rozložení v těle hostitele není rovnoměrné. Mění se v závislosti na okolní teplotě, která ovlivňuje schopnost fytoplazmy rozmnožovat se. Fytoplazmy se lépe množí při nižších teplotách, vysoké letní teploty způsobují jejich nerovnoměrné rozložení a nižší koncentraci v nadzemních částech rostliny. V zimě je koncentrace fytoplazmy v nadzemních částech rostliny snížena v důsledku stahování mízy do kořenového systému a degradace floému. Nerovnoměrné rozložení a koncentrace patogenu v nadzemních částech rostliny má dále vliv na to, jak silně se projeví příznaky infekce na rostlině (Schlesingerová, 2011).

Fytoplazmy způsobují různá onemocnění u více než 1000 druhů rostlin (Seemüller et Schneider, 2004), která mohou vést k poškození rostliny, plodů a někdy až k odumření rostliny. Mezi napadané druhy patří i ekonomicky velmi významné potravinářské plodiny. Výzkum fytoplazem je však mnohem náročnější než u ostatních volně žijících bakterií, jelikož tyto organismy není možné kultivovat na bezbuněčných médiích (Konnerth et al., 2016). Tato vlastnost je nejspíš způsobena jejich zvláštním metabolismem, nebo vyšší závislostí na hostiteli (Konnerth et al., 2016). Proto jsou tyto patogeny nedostatečně popsány po fyziologické a biochemické stránce.

Jelikož fytoplazmy postrádají buněčnou stěnu a jsou intracelulárními parazity, jejich povrchové proteiny jsou v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelských buněk (Konnerth et al., 2016). Předpokládá se tedy, že tyto proteiny hrají důležitou roli v komunikaci mezi parazitem a rostlinou či hmyzím přenašečem. Bylo zjištěno, že většinu membránových proteinů tvoří skupina nazvána imunodominantní membránové proteiny (IDPs) (Konnerth et al., 2016).

1.2 Imunodominantní membránové proteiny (IDPs)

Imunodominantní membránové proteiny jsou hlavní povrchové proteiny všech fytoplazem a jsou významnými v procesu komunikace patogenu s hostitelem (Konnerth et al., 2016). Můžeme je rozdělit do tří skupin: imunodominantní membránový protein (Imp), imunodominantní membránový protein A (IdpA) a antigenní membránový protein (Amp). Některé fytoplazmy kódují více skupin imunodominantních membránových proteinů zároveň, například Western X disease fytoplazma kóduje Imp i IdpA (Konnerth et al., 2016). I když spolu

transmembránové části imunodominantních membránových proteinů sdílí výraznou podobnost, jsou v rámci každé z těchto tří skupin vysoce variabilní. Předpokládá se, že tyto proteiny podléhají silnému selekčnímu tlaku (Konnerth et al., 2016). Je pravděpodobné, že proměnlivost imunodominantních membránových proteinů, získaná pozitivní selekcí, fytoplazmám umožňuje zvýšení jejich virulence, přežití v hostiteli nebo lepší pohyblivosti v těle hostitele (Konnerth et al., 2016). Velká variabilita je využívána i při vstupu patogenu do rostliny. Imunitní systém rostliny dokáže podle povrchových proteinů bakterii identifikovat a zničit ji (pokud je již daný patogen pro rostlinu známý), patogen ji ale prostřednictvím mutací v genu *Imp*, ke kterým dochází v rámci pozitivní selekce, dokáže oklamat a infikovat. Ze všech povrchových proteinů podléhají pozitivní selekci pouze imunodominantní membránové proteiny. U proteinů *Imp* a *Amp* bylo potvrzeno, že většina aminokyselinových míst, která jsou hlavním cílem pozitivní selekce, je lokalizována na hydrofilním extracelulárním konci proteinů (Konnerth et al., 2016).

1.2.1 Genomická organizace

Každý z výše zmíněných imunodominantních membránových proteinů je přítomen v jiné části genomu fytoplazmy (Konnerth et al., 2016). Lokalizace genů, kódujících *Imp*, *Amp* a *IpdA* v genomu fytoplazmy je zachována napříč různými kmeny, a to i v případě, že kódují více než jeden imunodominantní membránový protein (Konnerth et al., 2016).

1.2.2 Rekombinantní imunodominantní membránové proteiny

Rekombinantní imunodominantní membránové proteiny mohou být exprimovány prostřednictvím *E. coli*. Tyto rekombinantní proteiny mohou být následně využity k výrobě protilátek specifických pro imunodominantní membránové proteiny (Konnerth et al., 2016). Protilátky mohou sloužit jako specifický nástroj při studiu expresních vzorců imunodominantních membránových proteinů v těle infikované rostliny (Konnerth et al., 2016). Protilátky byly také využity pro lokalizaci fytoplazmy pomocí *in situ* imunofluorescence, imunosorbent elektronové mikroskopie a zlatem značených protilátek (Konnerth et al., 2016). Rekombinantní imunodominantní membránové proteiny jsou také velmi důležitým nástrojem pro studium protein – protein interakce pomocí pull-down zkoušek a far-western blot analýzy (Konnerth et al., 2016).

1.2.3 Struktura proteinů

Jednotlivé typy imunodominantních membránových proteinů se od sebe svou strukturou lehce odlišují, ale každý z nich se skládá z transmembránové oblasti, krátkého, často hydrofobního, N – konce, který je intracelulární a velkého hydrofilního C – konce, který je extracelulární, variabilní a hraje hlavní roli v interakci s hostitelem (Seemüller et Schneider, 2004). Molekulární hmotnost imunodominantních membránových proteinů se pohybuje mezi 15, 7 až 23 kDa (Konnerth et al., 2016).

Antigenní membránový protein (Amp) se skládá z velké hydrofilní extracelulární oblasti obklopené dvěma hydrofobními oblastmi blízko u C a N – konců. Část C – konce antigenního membránového proteinu tvoří transmembránovou oblast, druhá část je intracelulární. N – konec tvoří nejspíš začátek sekvence Amp a v průběhu růstu bakterie je jeho transmembránová oblast odštěpena od extracelulární hydrofilní oblasti (Konnerth et al., 2016).

Imunodominantní membránový protein A (IdpA) se skládá ze dvou hydrofobních oblastí blízko u C a N – konců a velké centrální hydrofilní oblasti, která je extracelulární, nedochází u ní k odštěpení a je ukotvena k cytoplasmatické membráně prostřednictvím dvou transmembránových oblastí. C a N – konce jsou intracelulární (Konnerth et al., 2016).

Imunodominantní membránový protein (Imp) se skládá z hydrofobního N – konce, jehož částí je zanořen do cytoplasmatické membrány a druhou částí je intracelulární, a hydrofilního C – konce, který je extracelulární (Konnerth et al., 2016). Tento povrchový protein je u fytoplazmy proliferace jabloně doposud jediný identifikovaný imunodominantní membránový protein, a proto byl vybrán pro přezkoumání v rámci mé bakalářské práce.

1.3 Fytoplazma proliferace jabloně ('*Candidatus Phytoplasma mali*')

Fytoplazma proliferace jabloně - '*Candidatus Phytoplasma mali*' se řadí do 16SrX skupiny na základě RFLP sekvence 16S rRNA genu (Zhao et Davis, 2016), společně s dalšími patogeny dřevin '*Candidatus Phytoplasma pyri*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', způsobujících chřadnutí hrušně, respektive evropskou žloutenku peckovin (Bohunická et al., 2018). Sekvence 16S rDNA těchto patogenů ukazují, že každý z nich představuje unikátní mikroorganismus, nicméně jsou si vysoce fylogeneticky příbuzní (Seemüller et Schneider, 2004). Navzájem se liší méně než 2 – 5% pozic nukleotidů 16S rDNA (Seemüller et Schneider, 2004). Délka celého genomu '*Candidatus Phytoplasma mali*' pak činí 600 – 640 kb a na rozdíl od ostatních fytoplazem, které mají kruhové chromozomy, má lineární chromozomy (Seemüller et al., 2011).

1.3.1 Proliferace jabloně

Proliferace jabloně je jedna z ekonomicky nejvýznamnějších chorob způsobených fytoplazmou v Evropě. Přítomnost proliferace jabloně byla v posledních desetiletích potvrzena téměř ve všech státech Evropy (Seemüller et al., 2011) a poprvé byla popsána v Itálii (Seemüller et Schneider, 2004). Hlavními hostiteli fytoplazmy proliferace jabloně jsou druhy rodu jabloň (*Malus* Mill.) a projevuje se řadou specifických i nespecifických symptomů na nových výhoncích, listech, plodech a kořenech (Seemüller et al., 2011).

1.3.2 Symptomy proliferace jabloně

Prvním pozorovatelným symptomem je od pozdního léta až do poloviny listopadu červenání listů, na rozdíl od normálního žloutnutí. V prvních měsících (únor až březen) následujícího roku dochází u napadených jabloní k tvorbě metlovitosti, potlačení apikální dominance a růstem normálně dormantních axilárních pupenů horní části silných výhonků. Tento symptom patří mezi nejvýraznější. U slabších výhonků, nebo i později v sezóně se mohou místo metlovitosti objevovat listové růžice (Seemüller et al., 2011). Dále se mohou u napadených stromů vytvářet zvětšené palisty, jejichž výraznost je závislá na odrůdě napadené jabloně (Schlesingerová, 2011).

Mezi specifické symptomy tedy patří metlovitost, tvorba listových růžic na vrcholcích výhonů a zvětšené palisty. Naopak mezi nespecifické příznaky se řadí již zmíněné červenání listů, dále snížená velikost a kvalita plodů, snížená vitalita a růst, předčasné olistění, chloróza listů, pozdní kvetení, na kmeni se mohou objevovat nekrózy a kořeny mohou být nitkovité a zkrácené (Schlesingerová, 2011). Právě zmíněný negativní vliv na velikost a kvalitu plodů je hlavní příčinou velkých ekonomických ztrát. Až 80% plodů nemocných stromů se tak stává neprodejnými, jsou o 30 – 60% lehčí, barva je neuspokojivá a chuť nevýrazná (Seemüller et al., 2011).

Projevy symptomů jsou nepravidelné. Většina výše zmíněných symptomů se objevuje hlavně u mladých a nově napadených stromů v prvních několika letech po infekci patogenem. Poté rostliny přechází do latentní fáze, ve které je většina specifických i nespecifických symptomů potlačena vlivem nerovnoměrného rozložení a nízké koncentrace '*Candidatus Phytoplasma mali*' v nadzemních částech rostliny. Nedochozí však k naprostému uzdravení, patogen je stále v rostlině přítomen v kořenovém systému a produkce těchto stromů je zhruba o 40% nižší (Seemüller et al., 2011).

Projev infekce je dále závislý na typu podnože, druhu jabloně a liší se i mezi kultivary. Podnože se silným kořenovým systémem jsou k onemocnění náchylnější a citlivější (M4, M11, MM104) než podnože se slabým kořenovým systémem (M9) (Seemüller et al., 2011). U kultivarů Starking, McIntosh a Jonathan je produkce a vitalita stromů infekcí výrazněji snížena, než u kultivarů Idared a Spartan (Seemüller et al., 2011). Mezi silně vnímavé druhy můžeme zařadit jabloň domácí (*Malus x domestica*), poměrně odolný je japonský druh jabloň Sieboldova (*Malus sieboldii*) (Schlesingerová, 2011).

Vývoj symptomů je ovlivněný i samotnou fytoplazmou proliferace jabloně, respektive virulencí konkrétního genotypu bakterie (Seemüller et al., 2011).

1.3.3 Detekce

V případě, že napadený strom neprojevuje známky infekce, respektive nese pouze nespecifické symptomy, lze přítomnost patogenu ověřit prostřednictvím různých dostupných metod.

Z dostupných biologických testů lze využít roubování indikátorových rostlin, jako jsou například *Malus x domestica* kultivar Golden Delicious nebo *Malus x dawsoniana* (Seemüller et al., 2011). Doporučuje se roubovat kořeny, protože v kořenové soustavě je koncentrace fytoplazmy nejvyšší a nekolísá zde jako v nadzemních částech rostliny (Seemüller et al., 2011). Na jeden test by pak mělo být použito pět indikátorových rostlin a pozorování by měla být prováděna po dobu dvou vegetačních období. Roubování indikátorových rostlin je však velmi zdoluhavá metoda, která se vyznačuje nízkou citlivostí (Seemüller et al., 2011).

Potvrzení přítomnosti fytoplazmy v rostlině je možné i pomocí mikroskopických metod (Schlesingerová, 2011). Elektronová mikroskopie je však velmi drahá, časově náročná a málo citlivá. V minulosti častěji používanou mikroskopickou metodou detekce fytoplazmy byla fluorescenční mikroskopie, jelikož umožňovala práci s velkým počtem vzorků s uspokojivou citlivostí (Seemüller et al., 2011). Část tkání byla obarvena DNA fluorescenčním barvivem 4'-6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) a následně mikroskopována (Seemüller et al., 2011).

Imunologické detekční metody (ELISA, imunoblot, histologické aplikace protilátek) mají přibližně stejnou citlivost jako fluorescenční mikroskopie a ve srovnání s PCR metodami jsou levnější s možností zpracování většího množství vzorků naráz (Seemüller et al., 2011).

Nejvyužívanější metodou používanou pro detekci fytoplazmy proliferace jabloně je dnes však PCR (Polymerázová řetězová reakce). Většina využívaných primerů je lokalizována ve variabilním regionu 16S/23S rDNA. Při PCR reakci může často docházet k reaktivitě většiny primerů i s DNA ostatních fytoplazem z 16SrX skupiny, kvůli jejich blízké příbuznosti. Diferenciace těchto patogenů ale lze dosáhnout použitím restričních endonukleáz v rámci RFLP analýzy (Seemüller et al., 2011). Pro testování je využívána nested PCR, modifikace PCR, při které jsou využity dva páry primerů za účelem zvýšení specifity reakce. První pár amplifikuje delší fragment, který poté slouží jako templát, na který nasedá druhý pár primerů a amplifikuje kratší fragment. Při testování pomocí nested PCR se mohou objevovat i falešné pozitivní výsledky. Nested PCR však není nezbytná pro detekci fytoplazmy proliferace jabloně, detekce je možná i prostřednictvím real-time PCR s využitím ribozomálních nebo neribozomálních primerů v kombinaci s TaqMan sondami a SYBER green značením (Seemüller et al., 2011). Real-time PCR analýza je sice dražší než klasická PCR, ale je snazší, rychlejší a citlivější (Seemüller et al., 2011). Hlavní předností real-time PCR je možnost měření akumulace amplifikovaného úseku prostřednictvím fluorescenčního signálu

(Torres et al., 2005). Díky tomuto signálu lze získat hodnotu Ct (cycle of threshold), pomocí které můžeme vypočítat i počet získaných molekul. Další výhodou real-time PCR je absence post-PCR manipulace, při které hrozí nebezpečí kontaminace (Torres et al., 2005).

1.3.4 Ochranná opatření

Všechna ochranná opatření proti fytoplazmě jsou pouze nepřímá. Fytoplazma proliferace jabloně je podle zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, a vyhlášky č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů, regulovaným škodlivým organismem, vyskytujícím se v EU a závažným pro celé Společenství (Schlesingerová, 2011). Šíření tohoto organismu je tedy na území Evropské unie zakázáno a rostliny pocházející ze zemí mimo EU, ve kterých se fytoplazma proliferace jabloně objevuje, tak musí mít rostlinolékařské osvědčení před zahájením dovozu. Množitelské výsadby by měly být zakládány v oblastech bez přítomnosti fytoplazmy proliferace jabloně, například u lesů, které slouží jako bariéra při náletech hmyzích přenašečů. Množitelský materiál má také zákonem nařízenou kontrolu, která zabraňuje prodeji již napadených stromů. Důležitá je likvidace nakažených stromů, které se následovně stávají zdrojem nákazy a v neposlední řadě je taky velmi významná insekticidní ochrana rostlin v době náletů hmyzích přenašečů (Schlesingerová, 2011). V sadech ošetřených insekticidy je velikost populace přítomných přenašečů až o 69% nižší a tvořena hlavně dospělci (Šafářová et al., 2016). Slibná je také ochrana prostřednictvím odolných podnoží, konkrétně podnoží z *Malus sieboldii* (Schlesingerová, 2011). U testovaných rostlin s touto podnoží se neobjevily specifické symptomy a u většiny se vyvinuly normálně velké plody. Stromy v produkčních sadech by také měly být pravidelně testovány na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně prostřednictvím PCR testů (Seemüller et al., 2011).

1.4 Přenašeči

Fytoplazmy se nemohou šířit semeny hostitelských rostlin ani jejich pylem (Schlesingerová, 2011). Nejčastěji tedy dochází k jejich přenosu lidmi, respektive roubováním rostlin, nebo hmyzími přenašeči (Seemüller et al., 2011).

1.4.1 Přenos roubováním

K přenosu fytoplazem dochází spíše při roubování, jelikož je využita větší část rostliny než při očkování, při kterém se přenáší pouze pupen (Seemüller et al., 2011). Nejvyšší pravděpodobnosti přenosu dosáhneme roubováním kořenů, ve kterých je koncentrace patogenu nejvyšší a nekolísá jako v nadzemních částech rostliny, zvláště pokud je rostlina v latentní fázi. Možný je i přenos fytoplazmy prostřednictvím kořenových mostů (Seemüller et al., 2011).

1.4.2 Hmyzí přenašeči

Nejdůležitější metodou přirozeného přenosu je pro fytoplazmy přenos prostřednictvím hmyzích přenašečů. Hmyz pomocí bodavě savého ústního ústrojí sají šťávu floému společně s fytoplazmou, která poté napadá různé tkáně uvnitř těla hmyzu a dále se množí v jeho slinných žlázách (Mittelberger et al., 2017). Po určité době (až 80 dní) se nakažený hmyz stane infekčním a patogen ve slinách přenáší na další rostlinu, na které se živí (Mittelberger et al., 2017).

Přenašeči jsou zejména zástupci řádu polokřídlí (*Hemiptera*), konkrétně čeledi žilnatkovití (*Cixiidae*), křískovití (*Cicadellidae*) a merovití (*Psyllidae*). Z čeledi žilnatkovití je přenašečem fytoplazmy zlatého žloutnutí révy například žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus*) z rodu *Hyalesthes* (Mittelberger et al., 2017). Z čeledi křískovití je křísek trnkový (*Fieberiella florii*) z rodu *Fieberiella* v Německu občasným přenašečem fytoplazmy proliferace jabloně (Mittelberger et al., 2017). Z merovitých je poté asi nejčastějším vektorem fytoplazmy proliferace jabloně ve střední Evropě *Cacopsylla picta*, zástupce rodu *mera* (Mittelberger et al., 2017).

1.4.3 *C. picta* a *C. melanoneura*, přenašeči '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Cacopsylla picta a *mera* černožilná (*Cacopsylla melanoneura*) jsou hlavními aktivními přenašeči fytoplazmy proliferace jabloně v Evropě (Seemüller et al., 2011). Největší schopnost přenosu z těchto dvou zástupců mer má *C. picta* (Schlesingerová, 2011), která je úzce oligofágní (hostiteli mohou být příbuzné druhy v rámci jednoho rodu) na rodu *Malus*, zatímco *mera* černožilná je široce oligofágní až polyfágní (hostitelské rostliny nemusí být blízcě příbuzné) (Seemüller et al., 2011). Infekčnost mer je silně ovlivnitelná klimatickými podmínkami, které mají vliv na jejich reimigraci po zimě, vývoj larev a migraci nových dospělců (Jarausch et al., 2007). Dále je významným faktorem, ovlivňujícím infekčnost mer, množství kopií DNA fytoplazmy proliferace jabloně v jejich těle. Jedinci schopní přenosu patogenu do rostliny obsahují $10^6 - 10^8$ kopií DNA fytoplazmy proliferace jabloně (Jarausch et al., 2007).

Výše zmíněné mery ve stádiu adulta migrují do vyšších poloh, kde zimují na jehličnanech (Schlesingerová, 2011). Na konci zimy / začátku jara (březen, duben) *C. picta* odlétá ze svého úkrytu zpět na ovocné stromy, kde se po naklazení vajíček tvoří nová juvenilní generace, která se dále živí šťávami floému jabloní (Seemüller et al., 2011). *C. melanoneura* tento proces podstupuje ještě dříve než *C. picta*, a to od konce února do poloviny března. Hlavním hostitelem mery černožilné je však hloh, její vývoj může ale proběhnout i na jabloních, hrušních a mišpulích (Schlesingerová, 2011). Novou generaci *C. picta* můžeme na jabloních pozorovat v květnu a červnu, na začátku července odlétá zpět na svá zimoviště. *Mera* černožilná se na jabloních vyskytuje v květnu a v průběhu června už odlétá zimovat do vyšších poloh. Přítomnost fytoplazmy byla potvrzena i v těle prvních reimigrantů jabloní, což znamená, že dochází k retenci patogenu v těle hmyzího

přenašeče i přes období zimování (Seemüller et al., 2011). Na většině míst, kde je problém s výskytem fytoplazmy proliferace jabloně, se vyskytují oba tyto zástupci mery (Seemüller et al., 2011), schopnost mery černožilné přenášet fytoplazmu proliferace jabloně na hostitelské jabloně je však ve státech severně od Alp zanedbatelná (Jarausch et al., 2007).

Bylo také potvrzeno, že infikované samičky *C. picta* mohou klást již infikovaná vajíčka, a procento infikovaných potomků se zvyšuje s každým vývojovým stádiem jedince. Nakonec je tedy více jak 90% adultů F1 (první potomci rodičovské generace) generace infikovaných fytoplazmou proliferace jabloně (Mittelberger et al., 2017).

2 Materiály a metodika

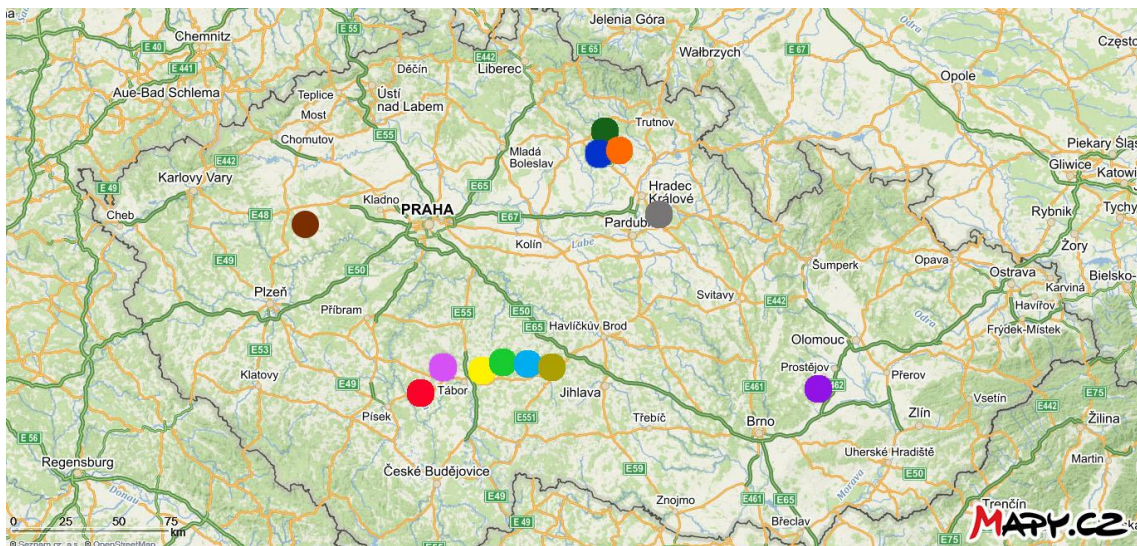
2.1 Materiál

Dvacet vzorků, zpracovávaných v laboratorní části bakalářské práce, bylo poskytnuto Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o. a 8 vzorků jsem sbíral společně s vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Markétou Bohunickou, Ph.D. Z vzorků VŠÚO byla již izolována DNA a byly testovány na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně pomocí real-time PCR analýzy, zbylých 8 vzorků jsem izoloval sám.

V průběhu mé bakalářské práce byly využity dva kity od firmy GeneAll, Exgene Plant SV mini a Expin™ Combo GP. Oba tyto kity byly poskytnuty Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy s.r.o.

2.2 Sběr vzorků

Vzorky byly sbírány ze starých, nebo příznakových stromů. Z každého stromu byly odebrány ideálně 4 dvouleté asi 8 cm dlouhé větvičky, z každé světové strany jedna. Byly zaznamenány GPS souřadnice každého stromu a vzorky byly popsány a uchovány v chladu do další manipulace (2 dny). Studovány byly vzorky z různých oblastí Čech, odebrané v letech 2015, 2016 a 2018. Testováno bylo celkem 28 získaných vzorků jabloní.



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.
 8. 9. 10. 11. 12.

Obr. 1: Mapa odběrových lokalit (Zdroj: mapy.cz). Z některých lokalit bylo odebráno více vzorků (viz Tab. 2).

Tab. 1: Popis bodů v mapě (viz Obr. 1)

Bod	Lokalita
1.	Zběšice
2.	Drhovice
3.	u Chýnova
4.	u Dolních Hořic
5.	Vysoká Lhota
6.	Pelhřimov
7.	Dětkovice
8.	Chlum
9.	Holovousy
10.	Býšť
11.	Klečetné
12.	Svatojanský Újezd

Tab. 2: Tabulka odběrových lokalit testovaných vzorků (JHC = Jihočeský kraj; VYS = Vysočina; JHM = Jihomoravský kraj; HKK = Královéhradecký kraj; PAK = Pardubický kraj; STC = Středočeský kraj)

Vzorek	Datum sběru	Lokalita	Kraj	GPS	Přesnost
AB282	02.12.2015	Zběšice	JHC	49°21'30,32"N; 14°24'55,66"E	10 m
AB285	02.12.2015	Zběšice	JHC	49°21'40,59"N; 14°24'38,00"E	15 m
AB287	02.12.2015	Zběšice	JHC	49°21'41,24"N; 14°24'39,30"E	10 m
AB288	02.12.2015	Zběšice	JHC	49°21'41,69"N; 14°24'39,17"E	10 m
AB289	02.12.2015	Drhovice	JHC	49°25'52,19"N; 14°33'08,16"E	5 m
AB290	02.12.2015	u Chýnova	JHC	49°24'30,22"N; 14°49'33,91"E	5 m
AB291	02.12.2015	u Dolních Hořic	JHC	49°25'43,73"N; 14°51'58,99"E	5 m
AB292	02.12.2015	Vysoká Lhota	VYS	49°25'07,37"N; 15°02'27,79"E	10 m
AB293	02.12.2015	Vysoká Lhota	VYS	49°25'07,30"N; 15°02'27,46"E	5 m
AB294	02.12.2015	Pelhřimov	VYS	49°26'29,11"N; 15°12'44,61"E	10 m
AB295	02.12.2015	Pelhřimov	VYS	49°26'26,81"N; 15°12'45,78"E	5 m
AB298	22.12.2015	Dětkovice	JHM	49°25'10,93"N; 17°04'22,15"E	5 m
AB299	22.12.2015	Dětkovice	JHM	49°25'11,51"N; 17°04'21,35"E	20 m
AB300	22.12.2015	Dětkovice	JHM	49°25'15,36"N; 17°04'18,89"E	5 m
AB301	22.12.2015	Dětkovice	JHM	49°25'17,98"N; 17°04'16,28"E	5 m
AB302	22.12.2015	Dětkovice	JHM	49°25'13,34"N; 17°04'20,03"E	5 m
AB545	07.03.2016	Chlum	HKK	50°23'02,83"N; 15°36'12,50"E	z mapy
AB544	24.02.2016	Holovousy	HKK	50°22'27,38"N; 15°34'12,01"E	z mapy
AB546	24.02.2016	Holovousy	HKK	50°22'27,38"N; 15°34'12,01"E	z mapy
AB547	24.02.2016	Holovousy	HKK	50°22'27,38"N; 15°34'12,01"E	z mapy
MB100	14.11.2018	Býšť	PAK	50°07'44,73"N; 15°54'36,79"E	z mapy
MB101	14.11.2018	Býšť	PAK	50°08'09,94"N; 15°54'39,38"E	z mapy
MB102	11.11.2018	Klečetné	STC	50°05'13,52"N; 13°33'40,96"E	z mapy
MB103	11.11.2018	Klečetné	STC	50°05'12,59"N; 13°33'40,47"E	z mapy
MB104	15.11.2018	Svatojanský Újezd	HKK	50°25'40,39"N; 15°32'28,95"E	z mapy
MB105	15.11.2018	Svatojanský Újezd	HKK	50°25'40,79"N; 15°32'27,70"E	z mapy
MB106	15.11.2018	Svatojanský Újezd	HKK	50°25'40,71"N; 15°32'28,33"E	z mapy
MB107	15.11.2018	Svatojanský Újezd	HKK	50°25'40,79"N; 15°32'28,56"E	z mapy

2.3 Přístrojové vybavení

Váhy – KERN EG220-3NM

Oscilační mlýnek Retsch MM 400

Vortex – IKA VORTEX Genius 3

Vyhřívavý blok – PCMT Thermoshaker Grant-bio

Mini centrifuga MyFuge

Centrifuga Eppendorf Mini Spin

Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer

PCR box

Real-time PCR cykly – Rotor-Gene Q

PCR cykly – Biometra TRIO

Lednička

Mrazák

Mikrovlnná trouba

Nádoba gelové elektroforézy MultiSUB Midi-96

Napájecí zdroj nanoPAC-300 Mini pro gelovou elektroforézu

UV transiluminátor – Uvitec BXT-F26.M

Fotoaparát na UV transiluminátor - UVIsave HD5

Osmikapilárový Sangerův sekvenátor – 3500 Genetic Analyzer

2.4 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna z lýka. V tomto kroku byla izolována celková DNA zahrnující DNA rostlinnou, fytoplazmy proliferace jabloně, případně i dalších organismů přítomných v odebraném lýku. Všechny centrifugační kroky byly prováděny při otáčkách 13400 RPM.

2.4.1 Potřebné nástroje a reagenty

Skalpelové čepelky na jedno použití a skalpelová rukojeť

Sterilní kovová špachtlička

Sterilní 1,5 ml mikrozkušavky

Sterilní mikrozkušavky se zámkem

Stojánky na mikrozkušavky

Ocelové kuličky o průměru 5 mm

Suchý led

Špičky s filtrem a bez filtru

Buničitá vata

Dekontaminační sprej Desprej

Izolace DNA z lýka odebraných větviček byla provedena pomocí kitu Exgene Plant SV mini. Kit obsahuje soubor pufrů (polární a nepolární rozpouštědla), SV kolonky ve sběrných zkumavkách a kolonky s EzSep filtrem. Produkt se nejprve váže na kolonku, ve které se nejdříve promývá a poté se AE pufrem z kolonky vymyje.

2.4.2 Postup izolace DNA

Pomocí sterilního skalpelu byla nejprve ze všech větviček odstraněna kůra. Poté bylo seškrábáno lýko, co nejrychleji naváženo 100 mg, respektive asi 116 mg lýka do mikrozkuvek se zámkem (klasická mikrozkuvka se zobáčkem na víčku, který slouží jako zamykací mechanismus) a kuličkou (z nerezové oceli o průměru 5 mm), dále byl každý vzorek zamražen na -80°C pomocí suchého ledu. 16 mg lýka navíc slouží jako rezerva, protože při vyndávání kuličky z mikrozkuvky, která slouží k rozdrčení lýka na prášek, dochází ke ztrátám. Takto připravené vzorky byly umístěny do namražených nástavců, které byly upevněny do ramen oscilačního mlýnku Retsch MM 400, pomocí kterého bylo zmražené lýko rozmělněno na prášek. Z mikrozkuvek byly poté odebrány kuličky a bylo přidáno 400 μl pufru PL a 3 μl roztoku RNasy A (100 mg/ml). Následovalo intenzivní zvortexování vzorků. Zvortexované vzorky byly inkubovány 15 minut při 65°C ve vyhříváném bloku a každých 5 minut bylo provedeno zvortexování. K homogenátu bylo přidáno 140 μl pufru PD, vzorky byly zvortexovány a poté inkubovány 5 minut na ledu. Homogenát byl následně přenesen pomocí tenké kovové špachtličky na EzSep filtr a centrifugoval se po dobu 2 minut. Proteklý lyzát (maximálně 420 μl) byl opatrně bez narušení pelety přenesen špičkou s filtrem do nové 1,5 ml mikrozkuvky. K lyzátu byl přidán pufr BD v množství 1,5 násobku objemu lyzátu a roztok byl okamžitě promíchán propipetováním.

Tab. 3: Objemy získaných lyzátů a použité objemy pufru BD (MB100 – MB107)

Vzorek	Objem lyzátu	Objem přidaného pufru BD
MB100	410 μl	615 μl
MB101	420 μl	630 μl
MB102	400,2 μl	600,3 μl
MB103	420 μl	630 μl
MB104	420 μl	630 μl
MB105	420 μl	630 μl
MB106	420 μl	630 μl
MB107	420 μl	630 μl

700 μl směsi bylo přeneseno na zelenou SV kolonku se sběrnou zkumavkou. SV kolonky se poté centrifugovaly 1 minutu. Proteklá tekutina se vylila, hrany sběrné zkumavky byly osušeny buničitou vatou a SV kolonka byla opět vsunuta do sběrné zkumavky. Na SV kolonku byl přenesen zbytek lyzátu a celý proces byl zopakován. Poté bylo na SV kolonku přidáno 700 μl pufru CW, kolonky se opět centrifugovaly 1 minutu. Proteklá tekutina se vylila, hrany sběrné zkumavky byly osušeny buničitou

vatou a SV kolonka byla opět vsunuta do sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 300 μ l pufru CW a celý proces se opakoval. Po vsunutí kolonky do osušené sběrné zkumavky byly kolonky centrifugovány 1 minutu, aby byl pufr CW z filtru zcela odstraněn. Po stočení byly SV kolonky opatrně vloženy do čistých a popsaných 1,5 ml mikrozkuvek. Na SV kolonku bylo přidáno 100 μ l pufru AE, který se poté nechal inkubovat po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Kolonky, vložené v 1,5 ml mikrozkuvkách, byly dále 1 minutu centrifugovány. Nakonec byly kolonky vyhozeny a produkt zůstal v mikrozkuvce. U každého získaného vzorku byla změřena koncentrace a absorbance pomocí přístroje Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer, výsledky jsou uvedeny v tabulce (viz Tab. 4). Absorbance při 260 nm vyjadřuje koncentraci DNA (nejlépe absorbuje DNA) a absorbance při 280 nm její čistotu (nejlépe absorbují bílkoviny). Poměr těchto dvou hodnot tedy vyjadřuje čistotu získaného roztoku (1,8 až 2,0 čistý).

Tab. 4: Koncentrace a absorbance (260/280) z Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer

Kód vzorku	Koncentrace DNA ng/ μ l	Poměr 260/280
MB100	8,1	1,86
MB101	8,7	2,01
MB102	3,7	2,17
MB103	9,2	1,88
MB104	4,3	1,97
MB105	8,1	1,91
MB106	8,2	1,89
MB107	6	1,97

2.5 Real-time PCR analýza

Real-time PCR analýza byla prováděna v laboratořích Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. a jelikož se jedná o velmi citlivou a akreditovanou metodu, mohl jsem celému procesu pouze přihlížet.

V této fázi laboratorní práce byly všechny vzorky testovány na přítomnost fytoplazem skupiny 16SrX. Zda jsou nebo nejsou vzorky pozitivní, vyjadřuje hodnota Ct.

2.5.1 Potřebné nástroje a reagensie

Sterilní 1,5 ml mikrozkuvky

PCR stripy do Rotor-Gene Q

Stojánky na mikrozkuvky, stripy

Filtrované špičky

PCR voda

PCR komponenty (PhytoplX PmxII, Chloropl PmxII, qPCR 2x Blue Master Mix)

Dekontaminační sprej Desprej

2.5.2 Postup real-time PCR

V PCR boxu byl do stojánku připraven potřebný počet 0,1 ml stripů včetně mikrozkuvek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a syntetickou pozitivní kontrolu. Do dvou 1,5 ml mikrozkuvek byly namíchaný dva PCR mastermixy podle uvedené tabulky (viz Tab. 5).

Tab. 5: Premix pro real-time PCR

TopBio PmxI	Na 1 vzorek
PCR voda	7 μ l
PhytoplX nebo Chloropl PmxII	1 μ l
qPCR 2x Blue Master Mix	10 μ l
Celkem	18 μl

Chloropl PmxII se používá pro detekci chloroplastové DNA v rámci interní kontroly kvality izolované DNA a PhytoplX pro detekci fytoplazem skupiny 16SrX. Testovány tedy byly vždy dvě sady stejných vzorků zároveň, jednou v premixu s Chloropl PmxII a jednou v premixu s PhytoplX. Do stripů bylo pipetováno 18 μ l mastermixu a mimo PCR box 2 μ l DNA testovaného vzorku do příslušné mikrozkuvky. Po uzavření všech mikrozkuvek byly přidány 2 μ l syntetické pozitivní kontroly pro detekci fytoplazmy proliferace jabloně ESFY_Ctrl do příslušné mikrozkuvky. Při detekci fytoplazmy z jabloní se používá ESFY_Ctrl pro případ, že by došlo ke kontaminaci vzorků s templátovou DNA. ESFY_Ctrl je syntetická pozitivní kontrola fytoplazmy ESFY (Evropská žloutenka peckovin). Stripy se vzorky byly vloženy do real-time PCR cykleru Rotor-Gene Q a byla spuštěna PCR dle podmínek definovaných v tabulce (viz Tab. 6).

Tab. 6: Teplotní a časový profil real-time PCR reakce. Při teplotě 58°C dochází ke čtení v oranžovém kanálu (pro fytoplazmy) a zeleném kanálu (pro interní kontrolu)

1 cyklus:	94°C	5 min	Počáteční denaturace
50 cyklů:	94°C	20 s	Denaturace
	58°C	20 s	Annealing (nasednutí primerů)
	72°C	20 s	Elongace (syntéza DNA)

Po dokončení real-time PCR byla získána hodnota Ct, pomocí níž lze určit, zda jsou vzorky pozitivní na přítomnost fytoplazem skupiny 16SrX (negativní vzorky mají Ct \geq 36). Hodnota Ct (cycle of threshold) se rovná cyklu, ve kterém amplifikační křivka přesáhla fluorescenční práh v exponenciální fázi reakce. Čím dřív

amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, tím víc templátu (molekul) bylo ve vzorku na začátku reakce.

2.6 Amplifikace genu Imp

Vzorky byly dále připraveny na klasickou PCR, ve které byl naamplifikován gen Imp.

2.6.1 Potřebné nástroje a reagenty

Sterilní 1,5 ml a 0,2 ml mikrozkušavky

Stojánky na mikrozkušavky

Špičky bez filtru

PCR komponenty (Imp-Pma,py-F01; Imp-Pma-R02a; Imp-Pma-R02b; PPP master mix)

PCR voda

Dekontaminační sprej Desprej

2.6.2 Postup amplifikace genu Imp

V PCR boxu byl nejprve ze zásobních roztoků primerů (100 μM) připraven pracovní premix dle uvedené tabulky (viz Tab. 7). Premix obsahoval dva reverzní primery, protože oblast, kam primer nasedá, je variabilní. Přidáním obou variant reverzního primeru do reakce byly tyto různé varianty naamplifikovány.

Tab. 7: Pracovní premix primerů Imp-Pma,py-F01, Imp-Pma-R02a, Imp-Pma-R02b

Imp-Pma,py-F01	5 μl
Imp-Pma-R02a	2,5 μl
Imp-Pma-R02b	2,5 μl
PCR voda	40 μl
Celkem	50 μl Imp-AP

Poté byl do 1,5 ml mikrozkušavky v PCR boxu připraven premix pro samotnou PCR reakci. Pro reakci byl použit PPP master mix, pracovní premix primerů a PCR voda v objemu uvedeném v tabulce (viz Tab. 8).

Tab. 8: Premix pro PCR reakci (amplifikace genu Imp)

Složky premixu	Na 1 vzorek
PPP master mix	10 μl
Imp-AP	1 μl
PCR voda	7 μl
Celkem	18 μl

Do jednotlivých 0,2 ml mikrozkušavek označených čísly, počítá se s jednou mikrozkušavkou navíc pro negativní kontrolu, byl premix rozpipetován po 18 μ l a mimo PCR box byly přidány 2 μ l DNA testovaných vzorků. Mikrozkušavky byly zavřeny, obsah se promíchal a stočil. Vzorky byly vloženy do PCR cyklieru Biometra TRIO a byla spuštěna PCR reakce dle podmínek definovaných v tabulce (viz Tab. 9).

Tab. 9: Teplotní a časový profil PCR reakce (amplifikace genu Imp)

Lid:	99°C		Předeřtít víčka
1 cyklus:	95°C	5 min	Počáteční denaturace
40 cyklů:	95°C	30 s	Denaturace
	55°C	30 s	Annealing (nasednutí primerů)
	72°C	30 s	Elongace (syntéza DNA)
	72°C	5 min	Finální elongace
	8°C	hold	Finální chlazení

Po dokončení PCR reakce byly vzorky ihned zpracovány, nebo byly krátkodobě uskladněny v ledničce.

2.7 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza slouží jako kontrola, pomocí které lze ověřit, zda se naamplifikoval správný úsek DNA (požadovaný gen Imp).

2.7.1 Potřebné nástroje a reagentie

Odměrný válec

Špičky bez filtru

Erlenmeyerova baňka

Agaróza

5x TBE pufr

UV vizualizační činidlo SafeView

Marker (velikostní standard)

2.7.2 Postup gelové elektroforézy

Nejprve bylo nutné připravit pufr 0,5x TBE (pracovní roztok). Byl připraven 1 l roztoku smícháním 100 ml pufru 5x TBE, který byl poskytnut Výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovously s.r.o., s 900 ml vody. Poté bylo rozvařeno potřebné množství agarózy (1,8 g) v odměřeném 0,5x TBE pufru (90 ml) podle objemu elektroforetické vaničky, tak aby vznikl 2% agarózový gel, který je vhodný pro separaci krátkých DNA fragmentů (gen Imp je dlouhý přibližně 399 bp). Po úplném rozvařeni v mikrovlnné troubě byl gel chlazen pod tekoucí vodou, tak aby bylo možné kádinku udržet v ruce bez popálení. Nakonec bylo do gelu

přidáno UV vizualizační činidlo pro DNA SafeView (ABM) v koncentraci 1 μ l na 20 ml gelu, v našem případě bylo tedy použito 4,5 μ l. Ochlazený gel s UV vizualizačním činidlem byl opatrně nalit do elektroforetické vaničky s přichystanými hřebínky o požadovaném počtu zubů. Po ztuhnutí gelu byla odstraněna čela, vyjmuly se hřebínky a gel byl vložen do elektroforetické vany naplněné 0,5x TBE puforem. Do jednotlivých jamek byly nanесeny naamplifikované vzorky (20 μ l) včetně negativní kontroly (18 μ l) a dvou velikostních standardů. Elektroforéza běžela při konstantním napětí 100 V zhruba 30 minut (běh bylo nutné opticky kontrolovat). Po rozdělení vzorků byl vypnut zdroj napětí, gel byl vyjmut z elektroforetické vany a přenesen na UV prosvětlovač. Na prosvíceném gelu byla opticky zkontrolována negativní kontrola, gel byl vyfocen a vzorky byly dále zpracovány.

2.8 Purifikace DNA fragmentů z gelu

Purifikací DNA fragmentů jsme z vyříznutých gelových bločků získali pročištěný naamplifikovaný gen Imp, zbavený agarózového gelu, vyeluovaný do pufru EB. Všechny centrifugační kroky byly prováděny při otáčkách 13400 RPM.

2.8.1 Potřebné nástroje a reagenty

Skalpelové čepelky na jedno použití a skalpelová rukojeť

Sterilní 1,5 ml mikrozkušavky

Špičky bez filtru

Stojánek na mikrozkušavky

Pro izolaci byl použit izolační kit Expin™ Combo GP. Kit obsahuje soubor pufrů (polární a nepolární rozpouštědla) a SV kolonky ve sběrných zkušavkách. Produkt se nejprve váže na kolonku, ve které se nejdříve promývá a poté se EB puforem z kolonky vymyje.

2.8.2 Postup purifikace DNA fragmentů z gelu

Na UV prosvětlovači byly z gelu pomocí sterilního skalpelu co nejrychleji vyříznuty jednotlivé amplikony, které odpovídaly na stupnici markeru (velikostního standardu) délce hledaného genu Imp, a vloženy do popsaných 1,5 ml mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 500 μ l pufru GB. Vyříznuté gelové bločky se nechaly roztát při pokojové teplotě (30 – 60 minut), nebo se mikrozkušavky vložily do termobloku vyhřátého na 50°C (5 – 10 minut). Vzorky byly průběžně kontrolovány a občas zvortexovány. Po úplném rozpuštění bločků bylo přidáno 100 μ l isopropanolu. Směs (maximálně 700 μ l) byla přepipetována na SV kolonku ve sběrné zkušavce a centrifugována 1 minutu. Proteklá tekutina se vylila, hrany sběrné zkušavky byly osušeny buničitou vatou a SV kolonka byla opět vsunuta do sběrné zkušavky. Na SV kolonku bylo přidáno 500 μ l pufru GB a celý proces se opakoval. Poté bylo na SV kolonku napipetováno 700 μ l pufru NW a směs se nechala stát 1 – 5 minut. SV kolonka se následovně

nechala centrifugovat 1 minutu. Proteklá tekutina se vylila, hrany sběrné zkumavky byly osušeny buničitou vatou a SV kolonka byla opět vsunuta do sběrné zkumavky. SV kolonka se opět nechala 1 minutu centrifugovat při stejných otáčkách, aby se zcela odstranil NW pufr z filtru. Po stočení byla SV kolonka vsunuta do čisté a popsané 1,5 ml mikrozkuavky. Na SV kolonku bylo přidáno 30 – 80 μ l pufru EB (podle síly proužku konkrétního vzorku na UV prosvětlovači) a směs se nechala 1 minutu inkubovat při pokojové teplotě. Po 1 minutě se nechala SV kolonka, vložená v 1,5 ml mikrozkuavce, centrifugovat 1 minutu. Vyeluovaná DNA byla následovně zmrazena v -20°C .

2.9 Sekvenační reakce

Sekvence byla provedena Sangerovou metodou v laboratořích Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. Samotné sekvenaci musí předcházet sekvenační PCR reakce, při které vznikají různě dlouhé řetězce DNA ukončené dideoxynukletidem s vázaným fluorescenčním barvivem, které odpovídá danému typu nukleotidu. Směs těchto různě dlouhých sekvencí nukleotidů s dideoxynukleotidem na jednom z konců byla podrobena sekvenaci, která funguje na principu kapilární elektroforézy. Došlo tak k separaci různě dlouhých sekvencí v rámci jednoho vzorku a získání výsledného sekvenogramu.

2.9.1 Potřebné nástroje a reagenty

Sterilní 1,5 ml a 0,2 ml mikrozkuavky

Sterilní špičky s odstřiženou špičkou

Špičky bez filtru

Stojánek na mikrozkuavky

PCR komponenty (BigDye Terminator RR kit v3.1; BigDye Seq buffer 5x; 5 μ M Imp-Pma-R02b)

PCR voda

SAM Solution

BigDye XTerminator Solution

2.9.2 Postup sekvenační reakce

Nejprve byl připraven 5 μ M roztok primeru, který začíná sekvenci. Do 1,5 ml mikrozkuavky bylo napipetováno 2,5 μ l Imp-Pma-R02b (100 μ M primer) a 47,5 μ l PCR vody. Do stojánku byl připraven příslušný počet 0,2 ml mikrozkuavek popsaných čísly. Jako templáty v připravované sekvenační PCR reakci sloužily PCR amplikony přečištěné z gelu. Premix sekvenační reakce byl namíchan dle uvedené tabulky (viz Tab. 10).

Tab. 10: Premix pro sekvenační PCR reakci s 5 μ M primerem Imp-Pma-R02b

Složky premixu	Na 1 vzorek
BigDye Terminator RR kit v3.1	2 μ l
BigDye Seq buffer 5x	1 μ l
Primer (5 μ M Imp-Pma-R02b)	1 μ l
PCR voda	4 μ l
Celkem	8 μl

Po rozpipetování premixu do všech mikrozkušavek byly do každé mikrozkušavky přidány 2 μ l patřičného templátu. 0,2 ml mikrozkušavky byly umístěny do termocykleru a byl spuštěn program s parametry uvedenými v tabulce (viz Tab. 11).

Tab. 11: Teplotní a časový profil sekvenační PCR reakce

1 cyklus:	95°C	5 min	Počáteční denaturace
35 cyklů:	95°C	30 s	Denaturace
	55°C	20 s	Annealing (nasednutí primerů)
	60°C	4 min	Elongace (syntéza DNA)
	8°C	hold	Finální chlazení

Dalším krokem byla purifikace sekvenační reakce. K sekvenační reakci bylo přidáno 45 μ l SAM Solution a špičkami s odstřiženou špičkou 10 μ l BigDye XTerminator Solution. Směs byla vortexována 30 minut při přibližně 1200 RPM (směs musí být při vortexování homogenní). Směs byla stočena ve stolní minicentrifuze a následovně bylo napipetováno 25 μ l vzorku bez XTerminator partikulí a bublinek na dno sekvenační destičky. Vzorky byly poté analyzovány na osmikapilárovém Sangerově sekvenátoru – 3500 Genetic Analyzer.

2.10 Fylogenetický strom

Evoluční analýza byla provedena v programu MEGA X (Kumar et al., 2018). Evoluční historie byla odvozena použitím metody Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Procento replikovaných stromů, ve kterých byly příbuzné taxony sdruženy v průběhu bootstrap testu (1000 opakování), je zobrazeno vedle každé větve (Felsenstein, 1985). Délky větví fylogenetického stromu odpovídají evolučním vzdálenostem, které byly využity k odvození fylogenetického stromu. Evoluční vzdálenosti byly vypočítány použitím počtu rozdílů (počtu rozdílů bází na sekvenci) (Nei et Kumar, 2000). Tato analýza zahrnovala celkem 44 nukleotidových sekvencí. Všechny nejasné pozice byly odstraněny pro každý pár sekvencí (pairwise deletion). V konečném souboru dat bylo celkem 310 pozic.

2.11 Variabilita genu Imp

V programu MEGA X (Kumar et al., 2018) byl vytvořen distance matrix (p-distance). Pairwise distance (p-distance) vyjadřuje poměr mezi počtem všech bází a počtem těch, které se liší. Tento poměr je následně vynásoben stem (převeden na procenta) a odečten od 100 %. Nejnižší a nejvyšší získané hodnoty vyjadřují variabilitu genu Imp v rámci analyzovaných vzorků.

3 Výsledky

Cílem laboratorní části bakalářské práce byla identifikace genotypů kmenů fytoplazmy proliferace jabloně v ČR na základě studia variability genu pro imunodominantní membránový protein.

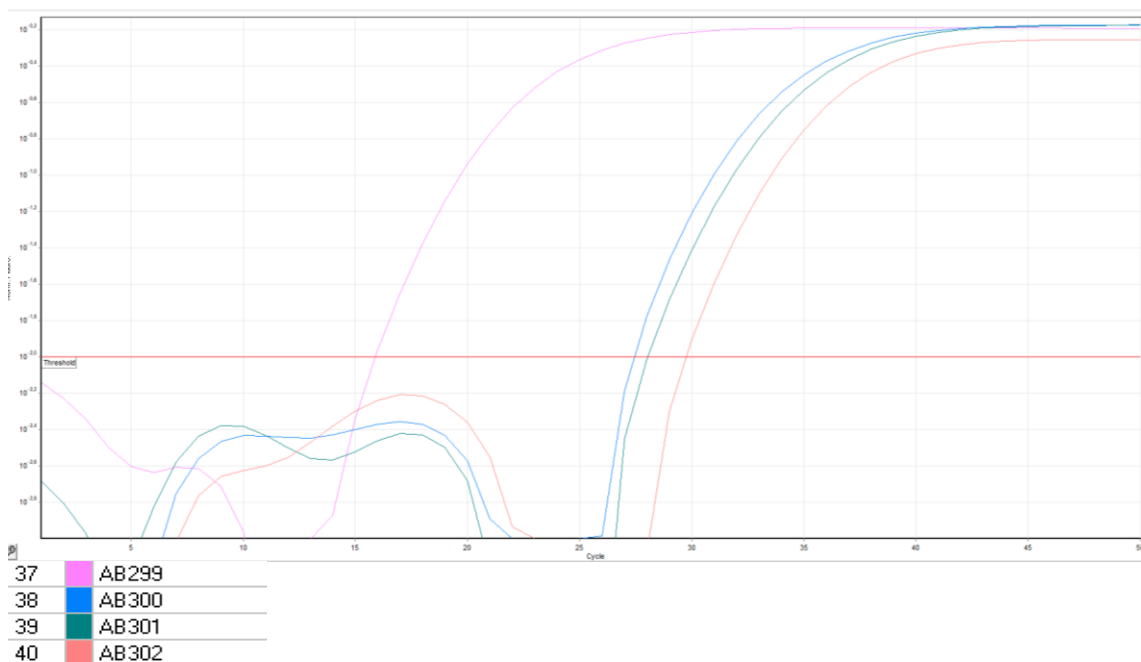
3.1 Detekce fytoplazem 16SrX skupiny

Fytoplazmy byly identifikovány akreditovanou metodou s využitím real-time PCR. Pomocí aplikace Rotor-Gene Q Series Software bylo, po dokončení PCR běhu, analyzováno celkem 28 vzorků. Vyhodnocení bylo dále provedeno odečtením hodnoty Ct v oranžovém kanálu pro detekci fytoplazem a v zeleném kanálu pro interní kontrolu kvality. Pro vyhodnocení všech real-time PCR běhů v aplikaci Rotor-Gene Q Series Software byly použity níže uvedené parametry (viz Tab. 12).

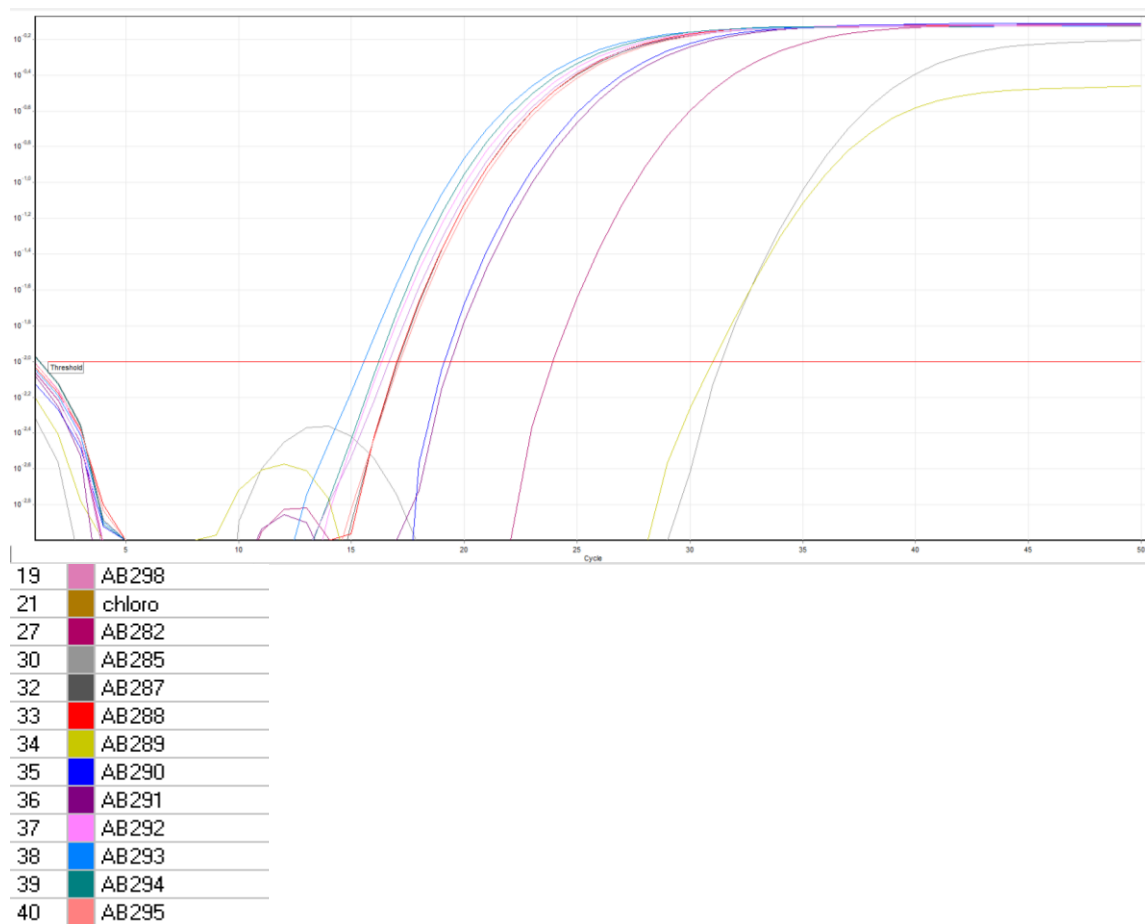
Tab. 12: Použité parametry pro analýzu dat real-time PCR

Dynamic tube:	ANO
Slope correct:	ANO
Threshold:	0,01

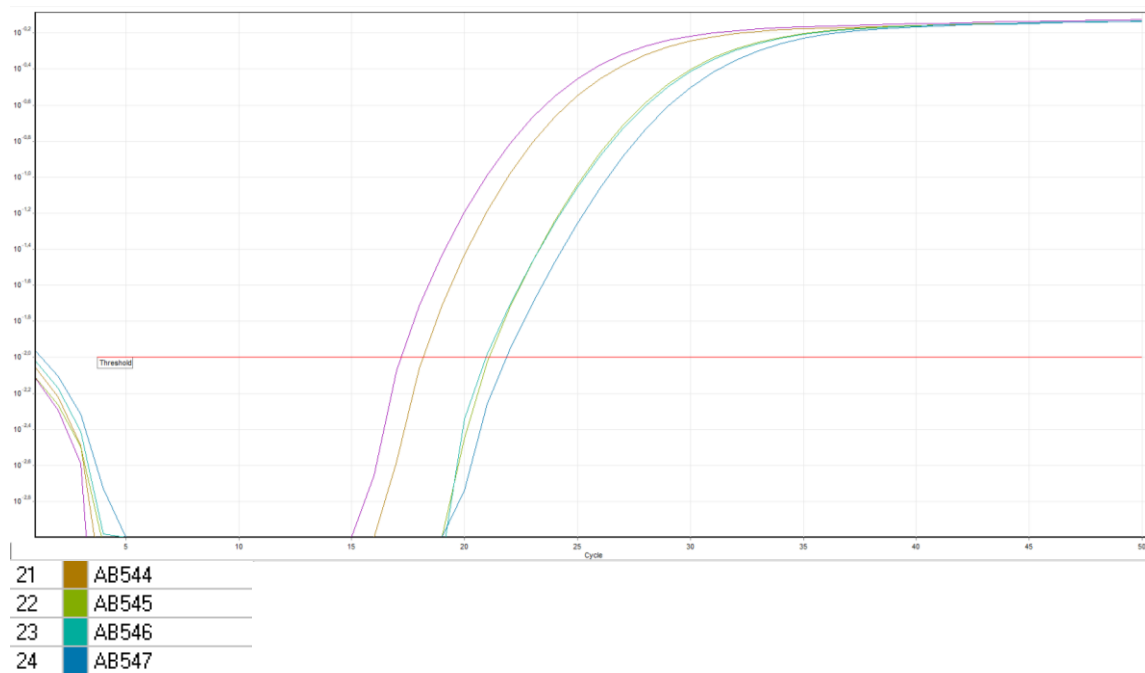
Průběh real-time PCR byl zaznamenán v podobě grafu, ve kterém každá křivka určité barvy znázorňuje konkrétní vzorek. Vzorky byly testovány v laboratořích Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. společně s dalšími vzorky VŠÚO. Proto je průběh real-time PCR 28 testovaných vzorků zaznamenán do čtyř různých běhů, které jsou uvedeny níže.



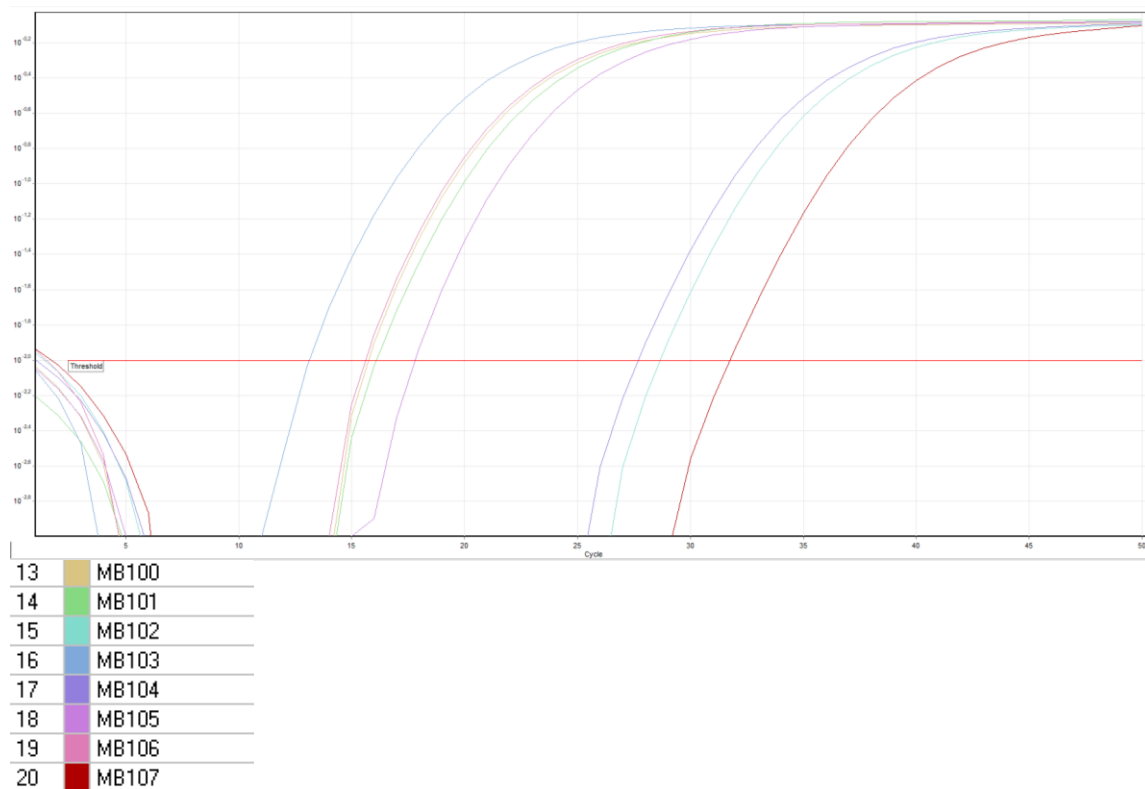
Obr. 2: Graf real-time PCR běhu č. 1 s nastavenými parametry (Osa X = počet odběhnutých cyklů, Osa Y = logaritmus fluorescence)



Obr. 3: Graf real-time PCR běhu č. 2 s nastavenými parametry (Osa X = počet odběhnutých cyklů, Osa Y = logaritmus fluorescence)



Obr. 4: Graf real-time PCR běhu č. 3 s nastavenými parametry (Osa X = počet odběhnutých cyklů, Osa Y = logaritmus fluorescence)



Obr. 5: Graf real-time PCR běhu č. 4 s nastavenými parametry (Osa X = počet odběhnutých cyklů, Osa Y = logaritmus fluorescence)

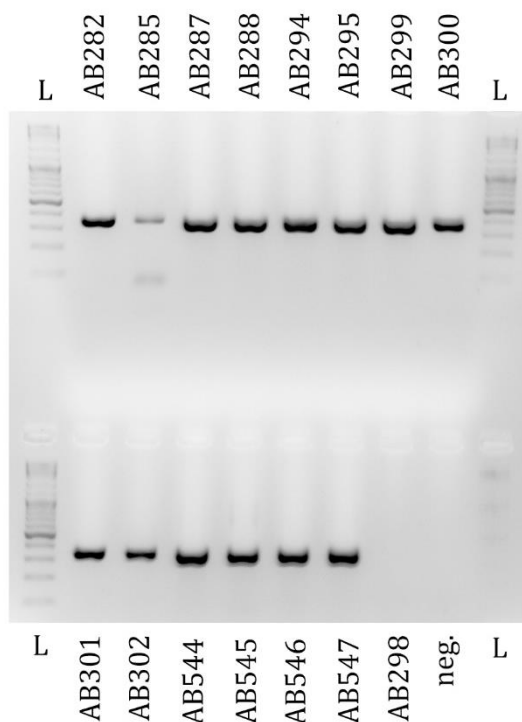
Po dokončení real-time PCR analýzy (po aplikaci parametrů dle Tab. 12) byla získána hodnota Ct pro každý z testovaných vzorků (viz Tab. 13). Z 28 testovaných vzorků byl jeden (AB298) negativní.

Tab. 13: Hodnoty Ct všech testovaných vzorků. Silně pozitivní Ct≤20,99 (+++); pozitivní Ct 21 – 29,99 (++); slabě pozitivní Ct 30 – 32,9 (+); potenciálně pozitivní Ct 32,91 – 35,99 (PP); negativní Ct≥36 (-). (NT = netestováno, nekvalitní sekvence; AP-B1 až AP-B4 a AP-A3 = získané genotypy v rámci této práce, popsány dále)

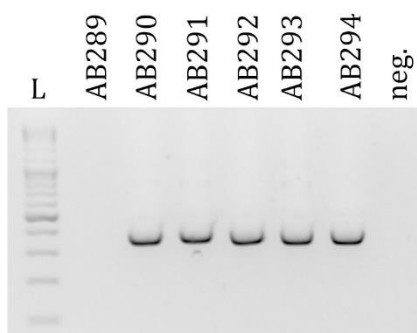
Bod na mapě	Vzorek	Ct	Kategorie	Větev
1.	AB282	23,91	++	AP-B1
1.	AB285	31,35	+	AP-B4
1.	AB287	17,06	+++	AP-B1
1.	AB288	17,02	+++	AP-B1
2.	AB289	31,01	+	NT
3.	AB290	19,11	+++	AP-A3
4.	AB291	19,37	+++	AP-B1
5.	AB292	16,34	+++	AP-B1
5.	AB293	15,56	+++	AP-A3
6.	AB294	16,2	+++	AP-B4
6.	AB295	17,14	+++	AP-B1
7.	AB298	-	-	NT
7.	AB299	15,9	+++	AP-B3
7.	AB300	27,41	++	AP-B3
7.	AB301	28,03	++	AP-B3
7.	AB302	29,72	++	AP-B3
8.	AB545	21,08	++	AP-B2 + AP-A3
9.	AB544	18,15	+++	AP-B1
9.	AB546	20,95	+++	AP-B1
9.	AB547	21,84	++	AP-B1
10.	MB100	15,73	+++	AP-B1
10.	MB101	16,1	+++	AP-B2
11.	MB102	28,64	++	AP-B1
11.	MB103	13,1	+++	AP-B1
12.	MB104	27,67	++	AP-B1
12.	MB105	17,8	+++	AP-B2
12.	MB106	15,59	+++	AP-B4
12.	MB107	31,74	+	NT

3.2 Gelová elektroforéza

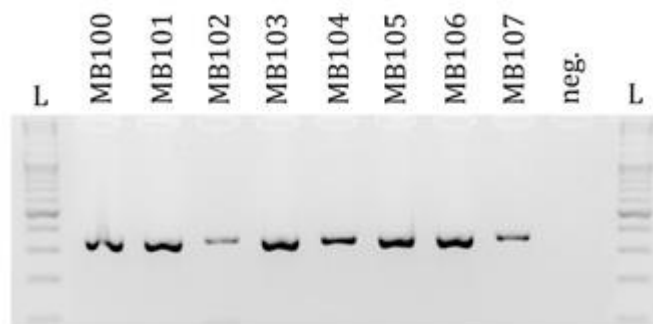
Prostřednictvím gelové elektroforézy bylo ověřeno, zda došlo k amplifikaci požadovaného úseku DNA fytoplazmy proliferace jabloně (genu *Imp*). Délka amplifikované oblasti činila přibližně 399 bp. Negativní kontrola slouží k ověření, zda při práci nedošlo k případné kontaminaci vzorků (viz Obr. 6, Obr. 7, Obr. 8).



Obr. 6: Amplifikovaný gen pro imunodominantní protein fytoplazmy proliferace jabloně (gel č. 1). 20 μ l PCR produktu, 2% gel, 100 V, 30 min. (L = 100 bp marker, silnější proužky pro 500 bp a 1000 bp; neg. = negativní kontrola)



Obr. 7: Amplifikovaný gen pro imunodominantní protein fytoplazmy proliferace jabloně (gel č. 2). 18 μ l PCR produktu, 2% gel, 100 V, 30 min. (L = 100 bp marker, silnější proužky pro 500 bp a 1000 bp; neg. = negativní kontrola)



Obr. 8: Amplifikovaný gen pro imunodominantní protein fytoplazmy proliferace jabloně (gel č. 3). 14,5 µl PCR produktu, 2% gel, 100 V, 30 min. (L = 100 bp marker, silnější proužky pro 500 bp a 1000 bp; neg. = negativní kontrola)

Gelová elektroforéza potvrdila, že gen pro imunodominantní protein byl úspěšně naamplifikován u všech testovaných vzorků, kromě vzorků AB289 a AB298. Vzorek AB298 byl již při real-time PCR analýze vyhodnocen jako negativní na přítomnost fytoplazmy, stejný výsledek se tedy dal předpokládat i po amplifikaci genu pro imunodominantní protein. Vzorek AB289 byl slabě pozitivní (dle hodnoty Ct 31,01), k amplifikaci hledaného genu pravděpodobně z tohoto důvodu nedošlo.

3.3 Analýza sekvencí

Získané sekvence byly zkontrolovány a nejasné pozice (chybné automatické vyhodnocení báze) upraveny v programu Chromas 2.6.6. Dále byl ze všech sekvencí vytvořen alignment, do kterého byly přidány další vzorky AP, PD a ESFY, dostupné z databáze GenBank. Každá získaná sekvence byla porovnána v BLASTu s ostatními dostupnými sekvencemi a do alignmentu byly přidány všechny 100% shodné vzorky reprezentující vždy odlišné místo původu. Alignment (viz níže) byl vytvořen ze sekvencí (celkem 44) o délce 310 bp.

	10	20	30	40	50	60	70
MG972422 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MF489207 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB104	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB103	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB102	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB100	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB547	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB546	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB544	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB295	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB292	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB291	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB288	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB287	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB282	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
FN600730 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB545b	tgctttagttttatatttaatttttagcttggctcatttagtttctggccTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB101	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MB105	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
FN658475 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MG972427 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MF489199 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB299	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
MG972423 AP	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB300	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					
AB301	TGCTTTAGTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTC	ATCAAAAAGTAAA					


```

LT594465 AP  ATTGGTCGAATTGGCTAATAAATTAA--TAACACCAAAAACTACTGAAGGCGATAAAACAACATCTTAT
FN658476 AP  ATTGGTCGAATTGGCTAATAAATTAA--TAACACCAAAAACTACTGAAGGCGATAAAACAACATCTTAT
FN600733 AP  ATTGGTCGAATTGGCTAATAAATTAA--TAACACCAAAAACTACTGAAGGCGATAAAACAACATCTTAT
FN600726 PD  TTTTGTAAAAGCTGCAAAAAAATAAAACCAACACAGAACCATAAGAAGAGATAAAAAACATCTTTT
MK101117 ESFY ATTTATAACATCTGCTAACAAATTA--TTAACACAGAACCTGATGCAAGATAAAAAACCATGTTT

                290          300          310
                ....|....|....|....|....|....|
MG972422 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MF489207 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB104       GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB103      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB102      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB100      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB547      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB546      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB544      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB295      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB292      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB291      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB288      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB287      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB282      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
FN600730 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB545b     GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB101      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB105      GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
FN658475 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MG972427 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MF489199 AP  GATTTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB299      GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MG972423 AP  GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB300      GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB301      GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB302      GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
LT594466 AP  GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
FN600731 AP  GATTTAGCCGTTGAATCATTGGGAAAAAATT
LT594467 AP  GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB294      GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB285      GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MB106      GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
FN600732 AP  GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
MG972424 AP  GATTCAGCCCTTGAATCATTGGGAAAAAATT
AB545a     AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
MF489204 AP  AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
AB290      AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
AB293      AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
LT594465 AP  AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
FN658476 AP  AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
FN600733 AP  AATTCAGCCGTTGAATCATTGAAAAAATT
FN600726 PD  AATGCAGCTAAAACAGCCTTGAGAAATT
MK101117 ESFY AACCAAGCAAAAGAATCATTTAGGGAAAAATT

```

Vzorek MB107 byl z alignmentu vyřazen. Nejspíš zde došlo ke kontaminaci, sekvence MB107 tak byla nekvalitní a nebylo možné ji porovnat s ostatními. Vzorek AB545 obsahoval dvě různé sekvence genu pro imunodominantní protein fytoplazmy proliferace jabloně. Vzorek tedy dál zpracoval RNDr. Radek Čmejla, Ph.D. z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. a byly dále analyzovány dvě nové sekvence AB545a a AB545b.

3.3.1 Variabilita genu Imp

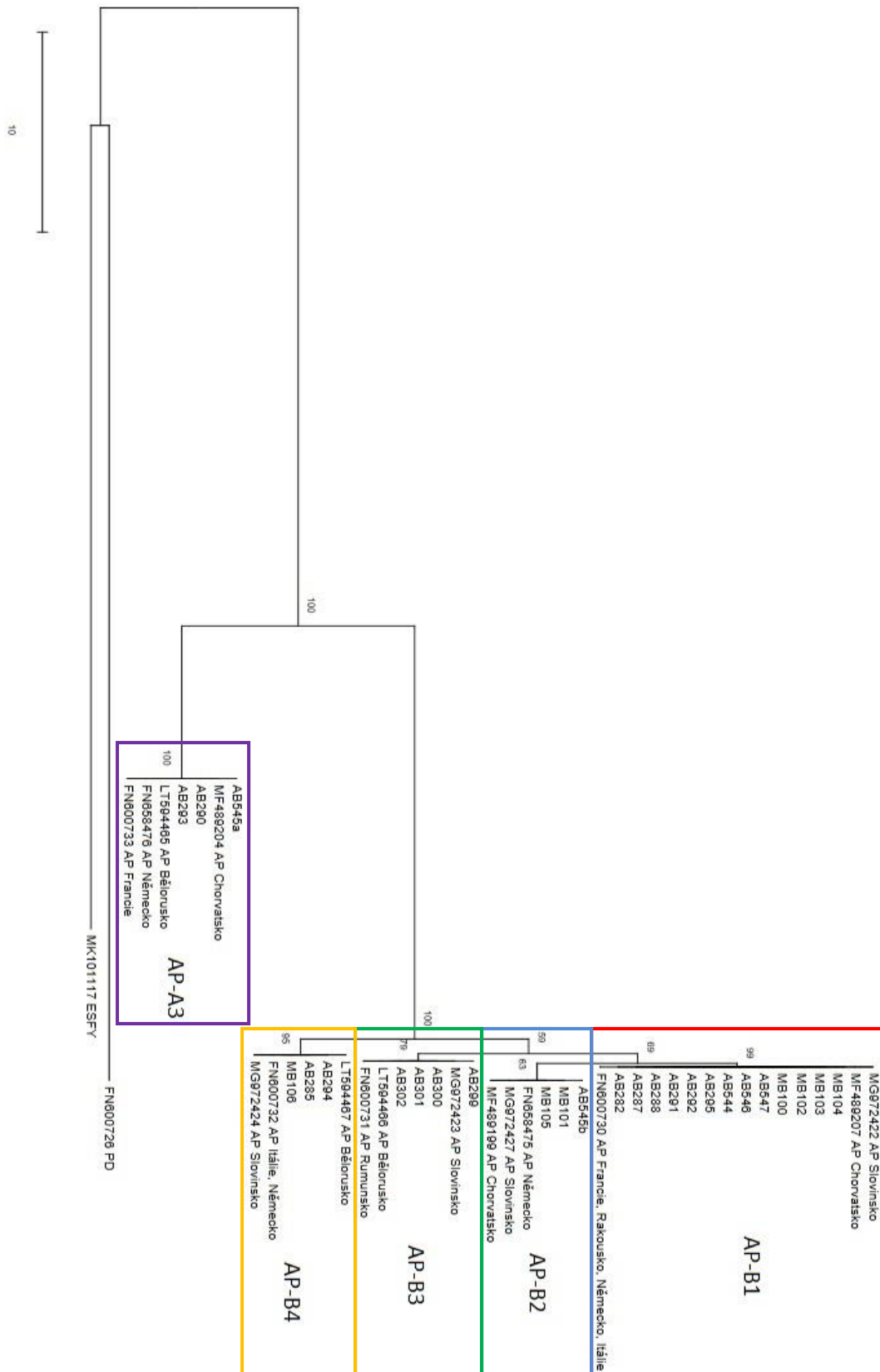
Tab. 14: Distance matrix (p-distance) genů Imp analyzovaných vzorků

AP-B1						
AP-B2	0,0033					
AP-B3	0,0033	0,0066				
AP-B4	0,0066	0,0099	0,0066			
AP-A3	0,1017	0,1017	0,0983	0,0983		
PD	0,3627	0,3593	0,3627	0,3593	0,3217	
ESFY	0,3402	0,3402	0,3402	0,3402	0,3014	0,3045

Variabilita genu Imp analyzovaných vzorků se pohybovala v rozmezí od 89,8 % do 99,7 % (viz Tab. 14).

3.3.2 Fylogenetický strom

Z výše sestrojeného alignmentu byl vytvořen fylogenetický strom (viz Obr. 9). Vzorky PD a ESFY, z databáze GenBank, byly do fylogenetického stromu zahrnuty, aby byla patrná genetická diference v rámci 16SrX skupiny rodu *Candidatus Phytoplasma*.



Obr. 9: Fylogenetický strom znázorňující podobnost mezi testovanými vzorky odebranými v ČR a ostatními příslušníky skupiny 16SrX na základě genu *Imp*. Fylogenetický strom byl vytvořen metodou Neighbor-Joining. (AP = fytoplazma proliferace jabloně; PD = fytoplazma chřadnutí hrušně; ESFY = fytoplazma evropské žloutenky peckovin; AP-B1 až AP-B4 a AP-A3 = získané genotypy fytoplazmy proliferace jabloně)

3.3.3 Geografické rozšíření

Dle vygenerovaného fylogenetického stromu bylo celkem 44 sekvencí genu Imp rozděleno do sedmi samostatných vývojových větví. Mezi pěti vývojovými větvemi příslušejícími k AP je velmi nízký počet změn, nejodlišnější jsou od většiny sekvencí vzorky AB290, AB293 a AB545a, které se od ostatních liší celkem v 39 pozicích nukleotidových bází (genotyp AP-A3). V celkovém souboru zpracovaných vzorků byla tedy zjištěna velmi nízká mezidruhová diverzita v rámci '*Candidatus Phytoplasma mali*' rodu *Candidatus Phytoplasma*. Získané genotypy fytoplazmy proliferace jabloně byly taky zaznamenány v dalších minimálně osmi státech Evropy (Slovinsko, Chorvatsko, Francie, Rakousko, Německo, Itálie, Bělorusko a Rumunsko) (viz Obr. 9). Jednotlivé genotypy byly označeny kódem v souladu s předchozími studiemi (Bohunická et al. 2018) a probíhajícím širším výzkumem genu Imp u '*Candidatus Phytoplasma mali*' na VŠÚO.

Větev AP-B1 zahrnuje vzorky odebrané v oblasti Jižních Čech, Západní Moravy, Východních Čech a Středních Čech (viz Tab. 2). Identický genotyp byl podle databáze GenBank zaznamenán také ve Slovinsku, Chorvatsku, Francii, Rakousku, Německu a Itálii (viz Obr. 9). Tento genotyp zahrnuje velkou část testovaných vzorků fytoplazmy proliferace jabloně (13).

Větev AP-B2 obsahuje vzorky AB545b, MB101 a MB105, a to z oblasti Východních Čech (viz Tab. 2). Sekvence vzorků je shodná s genotypem fytoplazmy proliferace jabloně zaznamenaným v Německu, Slovinsku a Chorvatsku (viz Obr. 9). Tento genotyp fytoplazmy proliferace jabloně se od genotypu vývojové větve AP-B1 liší pouze jednou nukleotidovou bází.

Větev AP-B3 fylogenetického stromu zahrnuje čtyři vzorky (AB299 – AB302), které byly odebrány v oblasti Jižní Moravy (viz Tab. 2). Totožný genotyp byl zaznamenán také ve Slovinsku, Bělorusku a Rumunsku (viz Obr. 9).

Větev AP-B4 zahrnuje vzorky odebrané v oblasti Jižních Čech, Západní Moravy a Východních Čech (viz Tab. 2). Genotyp se shoduje se sekvencemi vzorků z Běloruska, Itálie, Německa a Slovinska (viz Obr. 9).

Větev AP-A3 zahrnuje od ostatních sekvencí nejodlišnější vzorky. Vzorky byly odebrány v oblasti Jižních Čech, Západní Moravy a Východních Čech (viz Tab. 2). Totožný genotyp byl dále zaznamenán v Chorvatsku, Bělorusku, Německu a Francii (viz Obr. 9).

3.3.4 Příznaky onemocnění

Genotyp větve AP-B1 fylogenetického stromu způsoboval proliferaci jabloně, která se u hostitelských stromů projevovala většinou asymptomaticky, pouze v jednom případě (viz Tab. 15) způsobovala výraznou metlovitost a zvětšení palistů. Genotyp větve AP-B2 způsoboval u napadených stromů mírnou metlovitost. Genotyp větve AP-B3 se projevovat opět většinou asymptomaticky, pouze vzorek

AB299 způsoboval silnou metlovitost na obrostu kmene i koruně stromu. Genotyp větve AP-B4 se vyskytoval u stromů vyznačujících se výraznou metlovitostí, zakrslým vzrůstem a malými plody. Vzorek AB285 stejného genotypu se ale projevoval asymptomaticky. Genotyp větve AP-A3 se u všech hostitelů projevoval silnou či slabou metlovitostí na obrostu kmene i v koruně stromu.

Tab. 15: Symptomy jednotlivých genotypů fytoplazmy proliferace jabloně

Větev	Vzorek	Symptomy
AP-B1	AB282	bez symptomů
	AB287	mírné naznačení metlovitosti na obrostu kmene
	AB288	mírná metlovitost na obrostu kmene
	AB291	bez symptomů
	AB292	bez symptomů
	AB295	bez symptomů
	AB544	mírná metlovitost na obrostu kmene
	AB546	bez symptomů
	AB547	bez symptomů
	MB100	bez symptomů
	MB102	bez symptomů
	MB103	bez symptomů, malé plody
	MB104	výrazná metlovitost, palisty
	AP-B2	AB545b
MB101		nemocný strom (houbové infekce)
MB105		mírná metlovitost, malé plody
AP-B3	AB299	výrazná metlovitost na obrostu kmene i v koruně
	AB300	bez symptomů
	AB301	bez symptomů
	AB302	bez symptomů
AP-B4	AB285	bez symptomů
	AB294	výrazná metlovitost na obrostu i v koruně, zakrslý růst stromu
	MB106	bez výrazných příznaků, malé plody
AP-A3	AB290	metly na obrostu a v koruně
	AB293	mírná metlovitost na obrostu kmene
	AB545a	metlovitost na obrostu kmene

4 Diskuze

Tato bakalářská práce byla zaměřena na identifikaci získaných vzorků fytoplazmy proliferace jabloně, testovaných metodou real-time PCR, pomocí genu pro imunodominantní membránový protein (Imp). Gen Imp byl vybrán pro identifikaci jednotlivých genotypů této fytoplazmy, protože již v předešlých studiích byla zaznamenána vysoká variabilita v rámci sekvence nukleotidů tohoto genu. Ve srovnání s ostatními markery, mezi které patří geny aceF, pnp a secY, vykazoval gen Imp nejvyšší variabilitu s podobností sekvencí všech genotypů v rozmezí od 85,7 % do 99,8 %. U ostatních se tato hodnota pohybovala vždy nad 98 % (Dermastia et al., 2018). V rámci mé práce však byla zaznamenána variabilita genu Imp u '*Candidatus Phytoplasma mali*' 89,8 % - 99,7 % (viz Tab. 14), což je nižší variabilita než ta, která byla zaznamenána v rámci výzkumu probíhajícího ve Slovinsku (Dermastia et al., 2018). To mohlo být způsobeno tím, že v rámci mé práce bylo zaznamenáno pouze 5 různých genotypů. V rámci studie ve Slovinsku byl nejspíš zachycen i odlišnější genotyp, což vedlo k vyšší výsledné variabilitě. Ve srovnání s variabilitou genu Imp fytoplazmy chřadnutí hrušně (Bohunická et al., 2018) je gen Imp fytoplazmy proliferace jabloně méně variabilní. Vzhledem k funkci genu Imp je ale pravděpodobně stále nejlepším markerem pro odlišení různých genotypů fytoplazmy.

Dalším úkolem byl popis geografického rozšíření každého ze zachycených genotypů fytoplazmy proliferace jabloně v rámci Evropy. K 26 analyzovaným pozitivním vzorkům, jejichž geografické rozšíření bylo popsáno v České republice, byly dále přidány všechny dostupné identické sekvence z databáze GenBank (za každý stát jedna). Sestavený fylogenetický strom tak zahrnuje 5 dobře podpořených větví představujících jednotlivé genotypy (B1-4 + A3) (viz Obr. 9).

Vývojová větev AP-B1 fylogenetického stromu zahrnuje u nás nejrozšířenější genotyp fytoplazmy proliferace jabloně. Stejně je tomu tak i ve Slovinsku, Francii, Rakousku, Německu a Itálii (Dermastia et al., 2018), kde byl totožný genotyp vyhodnocen jako nejčastěji se vyskytující. V rámci této práce bylo zaznamenáno celkem 13 vzorků shodných s genotypem MG972422 (vývojová větev AP-B1) z celkem 26 identifikovaných pozitivních vzorků. Ostatní vzorky, které byly zařazeny do vývojových větví AP-B2, AP-B3 a AP-B4 se od genotypu větve AP-B1 liší pouze v rámci 1 až 2 pozic nukleotidových bází. Větev AP-A3 má genotyp od větve AP-B1 odlišný celkem v 39 pozicích nukleotidových bází z celkové zpracovávané délky sekvencí 310 bp. Vývojová větev AP-A3 obsahuje vzorky shodné s genotypem fytoplazmy proliferace jabloně (FN658476) zaznamenaným v Německu, kde byl tento genotyp vyhodnocen jako silně virulentní (Seemüller et al., 2010). Stromy, testované v rámci této bakalářské práce, ze kterých byl genotyp větve AP-A3 získán, byly vždy příznakové. Přítomnost patogenu se u testovaných stromů projevovala metlovitostí a dle hodnot Ct byly vzorky vyhodnoceny jako silně pozitivní, nebo pozitivní (viz Tab. 13). Stejnými symptomy, kterými se

projevoval genotyp fytoplazmy proliferace jabloně větve AP-A3, se ale vyznačoval vždy alespoň jeden vzorek i z ostatních vývojových větví (viz Tab. 15). Podle pozorovatelných symptomů tak není možné určit, o jaký genotyp fytoplazmy proliferace jabloně jde, ani zda je strom vůbec patogenem napaden. Například po několikaletém pozorování a testování stromů nakažených genotypy fytoplazmy proliferace jabloně z Německa a Francie bylo zjištěno, že stromy napadené slabě virulentními genotypy fytoplazmy proliferace jabloně se jeví jako naprosto zdraví jedinci, jen občas se objevovaly zvětšené palisty (Seemüller et al., 2010). Všechny vzorky, analyzované v rámci této práce, však byly ze stromů odebírány mimo vegetační sezónu, kdy se na nich objevuje minimum pozorovatelných příznaků (viz Tab. 2), jelikož se patogen nachází zejména v kořenové soustavě stromu. Proto nelze dle pozorovaných symptomů (viz Tab. 15) popsat jednotlivé získané genotypy. Ze sestavených tabulek (viz Tab. 13, Tab. 15) je také zřejmé, že míra positivity vzorků (hodnota Ct) nijak nekoreluje s virulencí genotypu či symptomy u napadených stromů.

Zajímavý je také výskyt dvou různých genotypů (AB545a, AB545b) v rámci vzorku AB545 (jedna rostlina). Rozlišení těchto dvou různých sekvencí bylo možné, protože se jednalo o dvě zřetelně odlišné sekvence. Mohlo se tedy stát, že i ostatní vzorky obsahovaly více odlišných sekvencí genu *Imp* v rámci jednoho vzorku, pouze je program, nebo já opravil dle silnějšího (výraznějšího) píku chromatogramu. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba použít metodu klonování (zaklonování amplikonů do *E. coli*). Osekvěnováním získaných kolonií by se tato hypotéza dala ověřit.

Z popisu geografického rozšíření jednotlivých získaných genotypů vyplývá, že rozšíření všech genotypů je přibližně stejné. Pouze genotypy vývojových větví AP-B3, AP-B4 a AP-A3 byly zachyceny i v chladnějších oblastech Evropy (viz Obr. 9). Genotyp větve AP-B3 fylogenetického stromu byl zachycen v rámci České republiky pouze v Jihomoravském kraji v okolí obce Dětkovice (viz Tab. 2, Tab. 13). Areál výskytu tohoto genotypu tak může být omezen pouze na oblast Východní Evropy, neboť z jiných oblastí v tuto chvíli shodný genotyp nebyl zaznamenán. Výskyt jednoho genotypu na více stromech ve stejné lokalitě by také mohl být zapříčiněn způsobem přenosu patogenu. Hmyzí přenašeč zde mohl patogen rozšířit i na ostatní jabloně v blízkém okolí. Pozoruhodný je také výskyt tří různých genotypů odebraných ze tří stromů v rámci jedné lokality (Svatojanský Újezd) (viz Tab. 13) vzdálených od sebe pouze pár metrů. To mohlo být způsobeno rozdílným stářím stromů, zavlečením již nakaženého stromu z jiné lokality, popřípadě migrací hmyzího přenašeče z odlišných oblastí, nebo roubováním již napadeného rostlinného materiálu.

Získaný fylogenetický strom je shodný se strukturou (tj. byly identifikovány stejné skupiny genotypů) fylogenetického stromu sestaveného na základě sekvencí genu *Imp* fytoplazmy proliferace jabloně ve Slovinsku (Dermastia et al., 2018) i

s fylogenetickým stromem vytvořeným ze sekvencí dostupných z databáze GenBank v roce 2018 (Bohunická et al., 2018). Fylogenetický strom vytvořený ze sekvencí dostupných z databáze GenBank se liší pouze v pozici genotypu větve AP-B2, který je zde přiřazen k větvi AP-B1, což mohlo být způsobeno použitím odlišných parametrů při vytváření fylogenetického stromu (liší se pouze v rámci jedné pozice nukleotidové báze). Nový fylogenetický strom byl srovnán také s fylogenetickým stromem pro '*Candidatus Phytoplasma pyri*' (Bohunická et al., 2018), ve kterém byla zaznamenána vysoká mezidruhová diverzita (17 genotypů, z toho 3 genotypy PD jsou dokonce evolučně bližší AP), a fylogenetickým stromem pro '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (Valasevich et Schneider, 2016), které patří do stejné skupiny (16SrX) v rámci rodu *Candidatus Phytoplasma*. Nově vytvořený fylogenetický strom byl po srovnání vyhodnocen jako silně homogenní s nízkou mezidruhovou diverzitou, stejně jako fylogenetický strom '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (Valasevich et Schneider, 2016).

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem se zabýval studiem fytoplazmy proliferace jabloně ('*Candidatus Phytoplasma mali*'), respektive variabilitou genu Imp. V první části práce byla sepsána rešerše na dané téma a v praktické části byla izolována a sekvenována část genomu fytoplazmy proliferace jabloně obsahující gen Imp. Sekvence byly dále zkontrolovány a ze všech pozitivních vzorků, včetně všech v tu dobu dostupných z databáze GenBank, byl vytvořen alignment. Alignment byl následně použit k vytvoření fylogenetického stromu, prostřednictvím kterého byla vyjádřena mezidruhová variabilita fytoplazmy proliferace jabloně a evoluční vztah vůči ostatním členům skupiny 16SrX. Dále byl fylogenetický strom použit k popisu geografického rozšíření jednotlivých získaných genotypů, ke kterým byly sepsány všechny pozorované symptomy analyzovaných genotypů proliferace jabloně.

Jelikož jsem však pracoval jen s malým množstvím vzorků, není možné ze získaných výsledků vyvozovat nějaké dalekosáhlé závěry. V souboru mnou zaznamenaných genotypů se neobjevuje žádný viditelný trend. V rámci rozsáhlejší studie by se však něco zjistit mohlo a součástí takové studie, pokud vznikne v rámci projektu Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o., budou i data získaná v této práci.

Seznam použité literatury

- Bohunická M., Valentová L., Suchá J., Nečas T., Eichmeier A., Kiss T., Čmejla R. (2018): Identification of 17 '*Candidatus Phytoplasma pyri*' genotypes based on the diversity of the imp gene sequence. *Plant Pathology* (67): 971 – 977.
- Dermastia M., Dolanc D., Mlinar P., Mehle N. (2018): Molecular diversity of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and '*Ca. P. prunorum*' in orchards in Slovenia. *European Journal of Plant Pathology* (152): 791 – 800.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* (39): 783 – 791.
- Jarausch B., Fuchs A., Schwind N., Krczal G., Jarausch W. (2007): *Cacopsylla picta* as most important vector for '*Candidatus Phytoplasma mali*' in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology* (60): 189 – 190, ISSN: 1721-8861.
- Konnerth A., Krczal G., Boonrod K. (2016): Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas. *Microbiology* (162): 1267 – 1273.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* (35): 1547 – 1549.
- Mittelberger C., Obkircher L., Oetl S., Oppedisano T., Pedrazzoli F., Panassiti B., Kerschbamer C., Anfora G., Janik K. (2017): The insect vector *Cacopsylla picta* vertically transmits the bacterium '*Candidatus Phytoplasma mali*' to its progeny. *Plant Pathology* (66): 1015 – 1021.
- Nei M. et Kumar S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. ISBN: 9780195135855.
- Saitou N. et Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* (4): 406 – 425.
- Schlesingerová G. (2011): *Candidatus Phytoplasma mali* Proliferace jabloně [online]. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou [cit. 19. 4. 2019]. Dostupné z WWW: http://eagri.cz/public/web/file/139699/proliferace_jablone.pdf
- Seemüller E., Carraro L., Jarausch W., Schneider B. (2011): Apple proliferation phytoplasma. In: Hadidi, A. Barba, M., Candresse, T. & Jelkmann, W. (eds.): *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, APS Press/American Phytopathological Society, p. 67-75, ISBN: 978-0-89054-501-0.

- Seemüller E., Kiss E., Sule S., Schneider B. (2010): Multiple Infection of Apple Trees by Distinct Strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' and Its Pathological Relevance. *Phytopathology* (100): 863 – 870.
- Seemüller E. et 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.
- Šafařová D., Starý M., Válová P., Opatíková M., Bílková L., Navrátil M. (2016): Impact of insecticides treatment on phytoplasma infection risk in apple orchards. *Horticultural Science* (43): 112 – 116.
- Torres E., Bertolini E., Cambra M., Montón C., Martín P. M. (2005): Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* (19): 334 – 340.
- Valasevich N. et Schneider B. (2016): Detection, identification and molecular diversity of 'Candidatus Phytoplasma Prunorum' in Belarus. *Journal of Plant Pathology* (98): 625 – 629.
- Zhao Y. et Davis E. R. (2016): Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (66): 2121 – 2123.