

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Martina Horníková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Detekce a kvantifikace

***Candidatus* Phytoplasma prunorum v planých
a kulturních hostitelích**

Bakalářská práce

Martina Horníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Chtěla bych poděkovat Prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za jeho trpělivost, ochotu i čas, který mi při psaní bakalářské práce věnoval, za jeho odborné rady, praktické připomínky a vysvětlení celé problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. a Janě Veselské za jejich pomoc a odborné rady při práci v laboratoři.

Souhrn

Fytoplazmy jsou ekonomicky významné rostlinné patogeny, které způsobují onemocnění ovocných stromů a činí tak obrovské finanční ztráty. Jsou detekovatelné několika biologickými a laboratorními metodami, z nichž je v současnosti nejvýznamnější metoda real-time PCR.

Cílem této práce bylo vybrat vhodný postup a primery pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci *Candidatus* Phytoplasma prunorum a dále stanovit relativní koncentrace této fytoplazmy ve vzorcích odebraných z příznakových a bezpříznakových stromů meruněk v semenném sadu meruněk Zahradnické fakulty Mendlovy univerzity v Lednici na Moravě.

Pro detekci a identifikaci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin byly použity primery rpLNS3f/rpLNSr2, fU5/rU3 a fAT/rPRUS. Výsledky relativního i absolutního stanovení koncentrace fytoplazem v jednotlivých vzorcích byly velmi variabilní a na hladině 99 % nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl v jejich koncentraci mezi příznakovými a bezpříznakovými stromy.

Summary

Phytoplasmas are economically important plant pathogens which induce diseases of fruit trees and that is why they induce huge financial losses. They are detectable with a number of biological and laboratory methods. Presently the most important is real-time PCR method.

The aim of this labour is to choose the suitable process and primers for quantitative polymerase chain reaction of *Candidatus* Phytoplasma prunorum. Then specify relative concentration of this phytoplasma in samples gained from symptomatic and asymptomatic apricot trees which arise out of seed plantation of Faculty of gardening, Mendel University, Lednice na Moravě.

For detection and identification of European stone fruit yellows phytoplasma were used rpLNS3f/rpLNSr2, fU5/rU3 and fAT/rPRUS primers. Results of relative and absolute determination of phytoplasma concentration in every single samples were high variable and the statistically evidential difference in their concentration between symptomatic and asymptomatic trees has not been specified on the 99% value.

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíle práce	9
3 Literární přehled	10
3.1 Fytoplazmy, původci onemocnění.....	10
3.2 Historie	10
3.3 Charakteristika fytoplazem.....	11
3.4 Fytoplazmy, ekonomicky významné patogeny	12
3.5 Způsoby přenosu.....	12
3.6 Projevy nákazy fytoplazmou	13
3.7 Detekce fytoplazem	13
3.7.1 Biologická detekce fytoplazem.....	14
3.7.2 Detekce fytoplazem fluorescenční mikroskopií.....	14
3.7.3 ELISA	14
3.7.4 PCR, RFPL a sekvencování.....	15
3.7.5 Kvantitativní PCR.....	16
3.8 <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum	17
4 Materiál a metody	19
4.1 Materiál.....	19
4.2 Izolace DNA	20
4.3 Příprava standardu pro kvantitativní PCR	21
4.3.1 PCR amplifikace neribozomálního segmentu rpLNS2f/ rpLNSr	21
4.3.2 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu	22
4.3.3 Purifikace PCR produktu	22
4.3.4 Ligace PCR produktu	23
4.3.5 Transformace bakterií <i>E.coli</i>	24
4.3.6 Izolace plazmidu	25
4.4 Absolutní a relativní stanovení koncentrace ESFY ve vzorcích.....	26
4.4.1 Nested PCR.....	27
4.4.2 Real-time PCR	28
4.5 Přístrojové vybavení laboratoře.....	31
5 Výsledky	32
5.1 Příprava standardu a kalibračních křivek pro kvantitativní PCR	32
5.2 Kvantitativní stanovení fytoplazmy v příznakových a bezpříznakových stromech	35
5.2.1 Stanovení absolutní a relativní koncentrace ESFY pomocí primerů rpLNS3f/rpLNSr2	35
5.2.2 Stanovení absolutní a relativní koncentrace ESFY pomocí primerů fU5/rU3	35
5.2.3 Stanovení relativní koncentrace ESFY pomocí primerů fAT/rPRUS	36
6 Diskuze	40
7 Závěr	42
8 Seznam použitých zkratk	43
9 Seznam použité literatury	44

1 Úvod

Tato práce se zabývá detekcí a kvantifikací *Candidatus Phytoplasma prunorum*. *Candidatus Phytoplasma prunorum*, neboli fytoplazma evropské žloutenky peckovin, napadá rod slivoní (*Prunus*) a působí značné ekonomické ztráty.

Fytoplazmy, prokarotické rostlinné patogeny, byly poprvé pozorovány v šedesátých letech dvacátého století. Napadají sítkovice rostlin a jsou přenášeny hmyzem. Napadené rostliny se vyznačují specifickými symptomy. Fytoplazmy je možné detekovat pomocí biologických a molekulárních metod, z nichž byla v této práci použita kvantitativní real-time PCR.

Smyslem této bakalářské práce bylo vybrat vhodný postup a primery pro detekci a kvantifikaci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin, a poté stanovit relativní koncentraci této fytoplazmy v příznakových a bezpříznakových stromech meruněk.

2 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma detekce a kvantifikace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.

V experimentální části bude proveden výběr vhodného postupu a primerů pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin a dále bude provedeno stanovení relativní koncentrace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v různých hostitelích s důrazem na příznakové a bezpříznakové stromy meruněk.

3 Literární přehled

3.1 Fytoplazmy, původci onemocnění

Fytoplazmy jsou rostlinné patogeny patřící do oddělení *Tenericutes*, třídy *Mollicutes* (Berges *et al.*, 2000). Předpokládá se, že se vyvinuly z grampozitivních bakterií skupiny laktobacilů (Bai *et al.*, 2004). Fytoplazmy osidlují sítkovce rostlin a jsou přenášeny hmyzem, který se živí nasáváním šťáv z floemu rostlin, především merami a křísi (Seemüller *et Schneider*, 2004).

V posledním desetiletí bylo díky sekvencování a RFLP analýze DNA fytoplazem a obzvláště potom ribozomální DNA zjištěno, že fytoplazmy je možno rozdělit do asi dvaceti skupin a podskupin. Protože fytoplazmy zatím nebylo možné kultivovat *in vitro* a je obtížné je izolovat z hostitelských buněk, jsou poznatky o nich stále nedostatečné (Boudon-Padieu *et al.*, 2004).

Jedná o ekonomicky významné organismy, protože zapříčiňují onemocnění ovocných stromů a způsobují tak obrovské finanční ztráty.

3.2 Historie

V šedesátých letech dvacátého století Doi *et al.* (1967) pozorovali pomocí elektronového mikroskopu malé organismy nacházející se v sítkovicích aster vykazujících výraznou žloutenku. Protože tyto organismy byly morfologicky a ultrastukturou podobné živočišným mykoplazmám, označili je jako „MLOs“ (dle anglického termínu „mycoplasma like organisms“).

V následujících třech desetiletích byly prováděny pokusy o izolaci těchto organismů a jejich kultivaci *in vitro*. Avšak pokusy byly neúspěšné a právě kvůli tomu bylo těžké tyto patogeny charakterizovat blíže a determinovat jejich taxonomický status. Proto tedy bylo dlouho neznámou, zda všechny MLOs organismy patří do třídy *Mollicutes*. Po mnohých pokusech byly MLOs ustanoveny za členy třídy *Mollicutes*,

hlavně proto že postrádají buněčnou stěnu a nelze je kultivovat *in vitro* a také na základě studia 16S rRNA a ribozomálního proteinu L22 (Gundersen *et al.*, 1994).

Mezinárodní komise systematické biologie v roce 1993 stanovila, že označení „MLO“ bude nahrazeno synonymem „phytoplasma“. A v roce 1994 Murray a Schleifer zavedli název „*Candidatus Phytoplasma*“ pro označení rodu rostlinných patogenů z řad fytoplazem (Seemüller *et al.*, 1998).

3.3 Charakteristika fytoplazem

Prokaryotické buňky fytoplazem nemají na povrchu buněčnou stěnu. Jsou obaleny pouze plazmatickou membránou a vyplněny cytoplazmou obsahující náhodně rozmístěné ribozomy a DNA uspořádanou až na výjimky do kruhového chromozomu (výjimkou je například fytoplasma proliferace jabloně s lineárním chromozomem). Je známo, že fytoplazmy, obzvláště v počátku infekce, existují i ve vláknité a větvené formě. Při pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že buňky fytoplazem jsou kulaté až vláknité s průměrem 200 – 800 nm (IRPCM, 2004).

Organismy třídy *Mollicutes* jsou charakterizovány malým genomem o velikosti 600 – 2200 kb (Marcone *et al.*, 1999), který má nízký obsah cytosinových a guaninových bází, asi 23-26 % (Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998). Velikost chromozomů fytoplazem se pohybuje v rozmezí 630-1350 kb (Marcone *et al.*, 1999). Genom fytoplazem obsahuje jedinečnou sekvenci CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT genu 16S rRNA (IRPCM, 2004). Funkci stop kodonu má u fytoplazem sekvence UGA (Bai *et al.*, 2004). Genom fytoplazem neobsahuje některé metabolicky významné geny, například gen pro ATP syntasu, k čemuž pravděpodobně došlo v důsledku adaptace na výživově bohaté prostředí (Kakizawa *et al.*, 2006).

Organismy rodu „*Candidatus Phytoplasma*“ jsou citlivé na antibiotika skupiny tetracyklinů, ale ne na penicilin a digitonin. Dále jsou citlivé na hypotonické prostředí (IRPCM, 2004).

Fytoplazmy přežívají a množí se pouze v hypertonickém prostředí, například v rostlinném floemu nebo vnitřních tkáních hmyzu. Rozmnožují se pučením,

přehrádečným dělením nebo fragmentací vláken. Jedná se o nutričně velmi náročné organismy, jejich existence je spojena mimo jiné s přítomností cholesterolu, jenž je součástí jejich plazmatické membrány (Seemüller *et al.*, 2004).

3.4 Fytoplazmy, ekonomicky významné patogeny

První záznamy evidující onemocnění spojené s osídlením rostlinného floému prokaryotickými organismy pocházejí z roku 1967. Od té doby jsou stovky syndromů rostlin spojovány právě s fytoplazmami (IRPCM, 2004).

V Evropě jsou ekonomicky nejvýznamnější onemocnění ovocných stromů, jako například proliferace jabloně, chřadnutí hrušně a evropská žloutenka peckovin. Tato onemocnění vedou ke snížení výnosu a kvality úrody (Seemüller *et al.*, 2004).

Přičemž proliferace jabloně je onemocnění vyskytující se pouze v Evropě a bylo poprvé popsáno v Itálii. ESFY se vyskytuje v Evropě, Turecku a bylo popsáno dokonce i v Japonsku. Chřadnutí hrušně bylo poprvé popsáno v severní Americe, kam se pravděpodobně rozšířilo z Evropy (Seemüller *et Schneider*, 2004).

3.5 Způsoby přenosu

Fytoplazmy osidlují rostlinné sítkovce a zřídka i průvodné parenchymatické buňky. Dále žijí ve střevech, hemolymfě, slinných žlázách a jiných orgánech svých vektorů, bodavě savého hmyzu, kterými jsou nejčastěji mery (*Psylloidea*) a křísi (*Psyllinea*) (IRPCM, 2004).

Přenašečem fytoplazem je hmyz, který se živí nasáváním šťáv z floemových tkání rostlin. Spolu se šťávou nasaje i fytoplazmu, která se dostane do jeho střeva, kde se začne množit. Po namnožení ve střevě se dostane do slinných žláz, odkud se po nabodnutí jiné rostliny dostane dovnitř této rostliny a infikuje ji. Tento hmyz fytoplazmy přenáší perzistentně, což znamená, že se fytoplazmy ve vektoru udržují a reprodukují po dlouhý

čas, často i po celý život vektora. U hmyzu můžou fytoplazmy způsobovat předčasnou smrt (McCoy *et al.*, 1989), ale většinou hmyz přežívá normálně.

Dále je přenos možný kokoticí (*Cuscuta campestris*) a vegetativním rozmnožováním pomocí roubů, řízků, oddenky, cibulemi nebo hlízkami (McCoy *et al.*, 1989).

3.6 Projevy nákazy fytoplazmou

Některé druhy rostlin, včetně hospodářsky významných, jsou vůči infekci fytoplazmou vnímavé a některé naopak tolerantní. V závislosti na hostiteli fytoplazmy způsobují mimořádné růstové změny. Tyto změny jsou důsledkem odnímání zásobních a růstových látek (např. sacharózy nebo kyseliny indol-3-octové) rostlině. Fytoplazmy se akumulují v sítkovicích, což způsobuje blokaci transportu látek v rostlině a to se projevuje změnami ve vývoji a růstu rostlin (IRPCM, 2004).

Mezi hlavní symptomy napadení rostlin patří redukce velikosti listů, proliferace axilárních pupenů, předčasné vadnutí, žloutenka a svinutka listů, prodlužování internodií. Projevem poruchy metabolismu je syntéza chlorofylu v okvětních lístcích květů, které jsou pak zelené. Květní orgány bývají často transformovány v listy (tzv. fylodie) a dochází k prodloužení květní stopky na 2 až 7 cm (IRPCM, 2004). Pro infekci fytoplazmou je typická sterilita květů. Napadení fytoplazmou je často bezpříznakové, pak mluvíme o latentní infekci (McCoy *et al.*, 1989).

Napadení hmyzu fytoplazmou zpravidla neprovází specifické symptomy, ale fytoplazmy u hmyzu mohou způsobovat mortalitu během embryonálního vývoje (IRPCM, 2004).

3.7 Detekce fytoplazem

Metody detekce fytoplazem můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, metody biologické (založené na roubování na indikátorové rostliny) a metody laboratorní (detekce

pomocí fluorescenční mikroskopie, real-time PCR, RFLP a sekvencování, ELISA) (Ahrens *et al.*, 1992; Jarausch *et al.*, 2001; Loi *et al.*, 2002; Seemüller *et al.*, 2004).

3.7.1 Biologická detekce fytoplazem

Biologická detekce fytoplazem se v současné době provádí pouze na dřevinách a to jejich roubováním na indikátorové druhy (Pastore *et al.*, 2001).

3.7.2 Detekce fytoplazem fluorescenční mikroskopii

Metoda detekce fytoplazem pomocí fluorescenční mikroskopie byla využívána hlavně v minulosti. Jedná se o metodu málo citlivou a druhově nespecifickou. Je založena na značení DNA fytoplazmy pomocí fluorochromu DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol). Barvení se provádí na tenkých řezech (10-15 μm) získaných ze stonků, řapíků nebo kořenů testovaných rostlin. Ihned poté jsou preparáty pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu. Přítomnost fytoplazmy je detekována světle až tmavě modrou barvou označených fytoplazem v sítkovicích napadených rostlin, což znamená, že jejich přítomnost je detekována, ovšem nemůžeme blíže určit, o jakou fytoplazmu se jedná (Ahrens *et al.*, 1992).

Výhodou této metody jsou rychlost, jednoduchost a nízké provozní náklady. Avšak je potřeba mít k dispozici kvalitní fluorescenční mikroskop a zmrazovací mikroton. Důležité jsou též zkušenosti pracovníka, protože ne vždy je jednoduché odlišit fluorescenci fytoplazmové DNA v sítkovicích od pozadí.

3.7.3 ELISA

Imunochemická metoda ELISA není v současnosti příliš využívána. Je založena na reakci povrchových antigenů s monoklonálními či polyklonálními protilátkami. Většina specifických protilátek je připravována pouze pro fytoplazmy, které se v hostitelích vyskytují ve vysoké koncentraci (Loi *et al.*, 2002).

V současnosti je metoda používána pro detekci fytoplazmy žloutenky aster (Barbara *et al.*, 2002).

3.7.4 PCR, RFPL a sekvencování

Pro detekci a identifikaci fytoplazem se v posledních letech nejvíce využívá polymerázové řetězová reakce, která nabízí obrovské výhody, jako jednoduchost provedení, možnost jejího přizpůsobení, vysokou specifitu a citlivost detekce a identifikace. PCR detekce je mnohem citlivější než mikroskopické a sérologické metody (Ahrens *et Seemüller*, 1994; Goodwin *et al.*, 1994) a navíc je vhodná i pro detekci nízkých koncentrací fytoplazem ve dřevinách (Ahrens *et Seemüller*, 1994).

Existuje několik způsobů jak detekovat fytoplazmu pomocí PCR primerů odvozených ribozomálních a neribozomálních částí chromozomu (Ahrens *et Seemüller*, 1992; Firrao *et al.*, 1993). Při využití ribozomálních primerů jsou detekovány samotné fytoplazmy nebo i další prokaryotické organismy. Z toho důvodu musí být amplifikované fragmenty určeny pomocí analýzy restrikčních míst nebo hybridizací se sondami specifickými pro daný patogen (Firrao *et al.*, 1993). Neribozomální primery jsou o něco specifitější, avšak pro přesnou identifikaci je využívána metoda délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) (Jarausch *et al.*, 1994). Pomocí RFLP analýzy jsou amplifikované produkty štěpeny různými restrikčními enzymy, naštěpené produkty jsou poté separovány pomocí elektroforézy, barveny ethidium bromidem a vizualizovány pomocí UV transluminátoru. Poté je porovnáním naštěpených fragmentů s kontrolními vzorky určen druh fytoplazmy (Lee *et al.*, 1998).

Dalším způsobem jak identifikovat fytoplazmu je sekvencování 16S rDNA-23S rDNA oblasti a následné porovnání této sekvence pomocí specializovaných programů a databází s identickými či podobnými sekvencemi (Wei *et al.*, 2007). Na základě sekvencování 16S rDNA fytoplazem bylo mimo jiné porovnáním zjištěno, že se jedná o uniformní organismy jejichž patogenita je fylogeneticky velmi úzce spojena (Seemüller *et Schneider*, 2004).

Tyto metody se spolu s dalšími molekulárními metodami používají například k intenzivnímu studiu fytoplazmy proliferace jabloně, evropské žloutenky peckovin i chřadnutí hrušně (Seemüller *et* Schneider, 2004).

3.7.5 Kvantitativní PCR

První zmínky o real-time PCR pocházejí z roku 1993 (Higuchi *et al.*, 1993). Než se tato metoda stala všeobecně uznávanou, trvalo to několik let. V současnosti je využívána k nejrůznějším účelům, protože umožňuje amplifikovat DNA a stanovit počet kopií templátové DNA ve vzorku, mimo jiné i k detekci a kvantifikaci fytoplazem (Christensen *et al.*, 2004).

Během real-time PCR reakce můžeme v reálném čase sledovat amplifikaci produktu v jednotlivých cyklech. Množství amplifikovaného produktu je možno vyjádřit dvěma způsoby. První možností je tzv. absolutní stanovení, které využívá kalibrační křivku, z níž je přímo odečítán počet kopií templátu. Druhou možností je tzv. relativní stanovení, které vyjadřuje v procentech změny množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole (Klein, 2002).

Úroveň specifity a citlivost detekce je závislá na použitých chemikáliích. Při použití fluorochromu, například SYBR® Green, je reakce méně specifická, protože SYBR® Green detekuje všechny dvoušroubovice DNA včetně nespecifických PCR produktů (může detekovat falešnou pozitivitu), proto pro dosažení přesných výsledků je potřeba reakci optimalizovat (Klein, 2002). Fluorochrom interkaluje do PCR produktu a emituje záření o specifické vlnové délce, které je detekováno optickou částí real-time cykléru (Galletto *et al.*, 2005). Při použití specifické sondy, například hydrolyzační sondy TaqMan®, dochází k hybridizaci sondy s PCR amplikonem, což umožňuje jeho přesnou kvantifikaci. Sonda nese na opačných koncích reporter, kterým bývá fluorescenční barvivo (FAM, JOE, TET; jeho volba je závislá na typu real-time cykléru a jeho excitačních a emisních kanálech), a zhášec (BHQ-1, DABCYL; jeho volba je závislá na emisním záření fluoroforu). Záření emitované fluorescenčním barvivem po jeho excitaci je pohlcováno zhášečem v případě, když jsou reporter a zhášec v těsné blízkosti. Značení TaqMan® sondou využívá 5'→3' exonukleázovou aktivitu DNA polymerasy, kdy

polymerasa degraduje přichycenou sondu, díky čemuž dochází k nárůstu fluorescence, protože reporter se nenachází v těsné blízkosti zhášedce. Pro správnou exonukleázovou aktivitu DNA polymerasy je nutná koncentrace hořčičných iontů okolo 5 mmol/l (Dötsch *et al.*, 2005). Nevýhodou TaqMan® sondy je, že pro každou sekvenci je nutno syntetizovat jinou sondu (Klein, 2002).

Na rozdíl od ostatních molekulárních metod je real-time PCR mnohem rychlejší, a pro detekci fytoplazem citlivější. Průběh reakce je urychlen použitím malého objemu reakční směsi. Další výhodou je, že není nutné vyhodnocovat PCR produkt pomocí elektroforézy, což snižuje riziko kontaminace laboratoře (Klein, 2002).

Metoda real-time PCR je v současnosti velmi využívanou metodou pro detekci a kvantifikaci fytoplazem, což dokladuje nespočet vědeckých článků na toto téma. Například Torres *et al.* (2005) použili real-time PCR spolu se sondou SYBR® Green I k citlivé a simultánní kvantifikaci fytoplazem skupiny proliferace jabloně (skupina 16SrX). Dále tuto metodu využili Martini *et al.* (2007) pro detekci a kvantifikaci *Candidatus Phytoplasma prunorum* v jejích hostitelích a hmyzím vektoru *Cacopsylla pruni*. Taktéž Yvon *et al.* (2009) detekovali a kvantifikovali ESFY pomocí real-time PCR. Pro detekci fytoplazem způsobujících žloutenku révy vinné použili tuto metodu Angelini *et al.* (2007).

3.8 *Candidatus Phytoplasma prunorum*

Pro *Candidatus Phytoplasma prunorum* existuje několik synonymních názvů. V České republice se nejčastěji setkáváme s názvem fytoplazma evropské žloutenky peckovin nebo zkratkou ESFY (pocházející z jednoho z anglických názvů). V anglicky mluvících zemích pak s názvy European stone fruit yellows phytoplasma, Apricot chlorotic leaf roll virus nebo Peach chlorotic leaf roll virus (EPPO).

ESFY můžeme taxonomicky zařadit do říše *Bacteria*, oddělení *Tenericutes*, třídy *Mollicutes*, řád *Candidatus Phytoplasma* (Seemüller *et al.*, 1998; Berges *et al.*, 2000; IRPCM, 2004).

Candidatus Phytoplasma prunorum napadá rod slivoní (*Prunus*), nejčastěji meruňku obecnou (*Prunus armeniaca*), broskvoň obecnou (*Prunus persica*), slivoň japonskou (*Prunus salicina*), případně i švestku domácí (*Prunus domestica*), ale v tomto případě se většinou jedná o bezpříznakovou infekci. Dále může přirozeně infikovat některé plevele, jako například svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*) nebo troskut prstnatý (*Cynodon dactylon*) (Németh, 1986). Přenos ESFY se uskutečňuje hmyzím vektorem, kterým je nejčastěji *Fieberiella florii*. *Candidatus* Phytoplasma prunorum byla detekována v několika evropských zemích, hlavně ve Francii, Německu, Řecku, Itálii, Rumunsku, Španělsku, Švýcarsku a v neposlední řadě v České republice (EPPO).

Symptomy onemocnění evropskou žloutenkou peckovin mohou být detekovány během celého roku. Avšak nejlepší doba pro sledování příznaků je před kvetením stromů a na konci léta. Nejlépe pozorovatelným příznakem je výrazná zakrslost infikovaných stromů. Dále můžeme pozorovat změny na listech, které jsou často svinuté s mírnou až silnou žloutenkou. Nejprve dochází k modifikaci listů na jednotlivých větvích, ze kterých se změny rozšíří do celé koruny stromu. Listy také mohou mít zmenšené čepele nebo předčasně opadávají. U slivoní japonských často dochází k redukci velikosti listů a ke zbarvení listů do červena. Po napadení stromu ESFY dochází k redukci počtu nasazovaných květů. Plody bývají obvykle menší, dozrávají předčasně a opadávají, nebo na větvích zasychají (EPPO).

Németh (1986) popsala tvar buněk *Candidatus* Phytoplasma prunorum jako pleiomorfní. Ovšem vyskytují se i ve vláknité formě, podobně jako *Bacillus acidophilus*. Pleiomorfní a vláknitý tvar fytoplazmy můžeme najít v mladých a čerstvě infikovaných buňkách rostlinného floemu. Ve starých a dlouho infikovaných buňkách je fytoplazma stlačená a degenerovaná (EPPO).

Evropská žloutenka peckovin výrazně ovlivňuje ekonomické výnosy z pěstování ovocných stromů. Stromy meruňek odumírají 12-24 měsíců po výskytu prvních syndromů v důsledku tohoto onemocnění. Broskvoň mohou odumírat podstatně dříve, v řádu týdnů. Slivoň japonská se často sama vyléčí, ale u meruňek je tento jev vzácný. Například ve Francii je ESFY zodpovědná za úhyn 60-70 % stromů meruňek (EPPO).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Experimentální část byla provedena se vzorky meruněk, které byly odebrány dne 25.7. 2008 v semenném sadu meruněk Zahradnické fakulty Mendlovy univerzity v Lednici na Moravě (viz. Tab. 1).

Tab. 1: Seznam vzorků použitých pro experimenty.

Číslo vzorku	Přesné určení místa odběru	Odebraný vzorek	Symptomy odběrových stromů
3431	Hargrand XIII/3 3. strom	lýko	příznakový
3432	Hargrand XIII/3 1. strom	lýko	příznakový
3433	Veselka III/8 2. strom	lýko	hnědnutí dřeva
3434	Olimp VIII/7 2. strom	lýko	bez symptomů
3435	Saldcot VIII/4 4. strom	lýko	příznakový
3436	Veselka III/8 1. strom	lýko	bez symptomů
3437	Hargrand XIII/3 2. strom	lýko	příznakový
3438	Collatis XXII/3 2. strom	lýko	příznakový
3439	Arzami Aromatnyj XI/11 5. strom	lýko	příznakový
3440	NJA-35 IX/11 2. strom	lýko	příznakový
3441	Churmai I/10 1. strom	lýko	příznakový
3442	Hargrand XIII/3 4. strom	lýko	bez symptomů
3443	LE 3204 XXVIII/1 2. strom	lýko	příznakový
3444	Murfatlar XII/9 2. strom	lýko	bez symptomů
3445	Hatio Colomer VIII/8 4. strom	lýko	příznakový
3446	Olimp VIII/7 3. strom	lýko	bez symptomů
3447	Saldcot VIII/4 1. strom	lýko	příznakový
3448	Murfatlar XII/9 1. strom	lýko	bez symptomů
3449	Hargrand XIII/3 5. strom	lýko	příznakový
3450	Poljus Junskij VIII/11 3. strom	lýko	příznakový
3451	Nachodskaja krajova 2. větev	lýko	bez symptomů
3452	LE 6034 3. strom, 2. větev	lýko	bez symptomů
3453	Pentagon 3. strom, 2 větve	lýko	bez symptomů
3454	Harcot 4. strom, 1. větev	lýko	chlorotická svinutka
3455	Veselka 3. strom, 1. větev	lýko	silná chlorotická svinutka
3456	Nachodskaja krajova 1. větev	lýko	chlorotická svinutka
3457	Harcot 4. strom, 2. větev	lýko	bez symptomů
3458	Iskra 2. strom, 1. větev	lýko	chlorotická svinutka
3459	Pentagon 3. strom, 1. větev	lýko	chlorotická svinutka
3460	Iskra 2. strom, 2. větev	lýko	bez symptomů
3461	Veselka 2. strom, 2. větev	lýko	bez symptomů
3462	LE 6034 3. strom, 1. větev	lýko	chlorotická svinutka

4.2 Izolace DNA

Ze segmentů odebraných větví bylo mechanicky odděleno lýko (cca 2 g), které bylo následně ve třecí misce homogenizováno spolu s 8 ml pracovního roztoku pufru Dellaporta 1x za přítomnosti malého množství (na špičku nože) mořského písku.

Pro odstranění hrubého balastu byl homogenát přelit do 30ml kyvety a centrifugován 4 min při 1000 rpm (4 °C). Vzniklý supernatant byl přes uhelon přelit do čisté kyvety a centrifugován 25 min při 14000 rpm (4°C), čímž došlo k zakoncentrování DNA fytoplazmy.

Pro uvolnění DNA do roztoku byl vzniklý sediment resuspendován ve 2 ml Doyle-Doyle pufru s přísádkem 5 µl merkaptoethanolu na vodní lázni (60 °C), kde byl ponechán 20 min. Následně byl lyzáát vychlazen, byly do něj přidány 2 ml směsi chloroformu a isoamylalkoholu a celá směs byla promíchána (převrácením), čímž došlo k odstranění bílkovin a ostatního balastu.

Poté byl lyzáát centrifugován 10 min při 6000 rpm (4 °C). Po centrifugaci bylo do mikrozkuřavky odebráno 0,5 ml čiré vodní fáze, do které byl následně přidán 1 ml izopropylalkoholu a směs byla promíchána (převrácením). Tímto krokem došlo k vysrážení izolované DNA.

Takto vzniklý vzorek DNA byl umístěn přes noc do mrazáku (-20 °C). Následující den byl vzorek centrifugován 10 min při 18000 rpm (4 °C), sediment byl promyt 1 ml 70% ethanolu a opět 10 min centrifugován při 18000 rpm (4 °C). Na závěr byl vzorek DNA rozpuštěn ve 100 µl deionizované vody.

Složení roztoků

<i>Dellaporta 2x</i>		<i>Dellaporta 1x</i>		<i>Doyle-Doyle</i>	
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	21,7 g	Dellaporta 2x	100 ml	CTAB Merk	12,5 g
KH ₂ PO ₄	4,1 g	Deionizovaná voda	100 ml	NaCl (5 M)	140 ml
Sacharóza	100 g	Kyselina askorbová	1,06 g	EDTA (0,5 M)	20 ml
BSA	1,5 g			TRIS (1 M, pH=8,0)	50 ml
PVP-10	20 g			PVP-40	5 g
Deionizovaná voda	500 ml			Doplňit do objemu 500 ml deionizovanou vodou	

4.3 Příprava standardu pro kvantitativní PCR

4.3.1 PCR amplifikace neribozomálního segmentu *rpLNS2f/rpLNSr2*

Pro přípravu standardu pro kvantitativní PCR bylo nutné amplifikovat DNA sekvenci fytoplazmy obsaženou v pozitivním vzorku, který byl předtím izolován z příznakového stromu meruňky a následně podroben PCR reakci a elektroforéze, která potvrdila přítomnost DNA fytoplazmy. Jednalo se konkrétně o vzorek číslo 2581 (Olimp VIII/7 3. strom; příznaky: chlorotická svinutka a prosychání; odebrán dne 25.7. 2008 v semenném sadu meruněk Zahradnické fakulty Mendlovy univerzity v Lednici na Moravě), který byl 5x naředěn.

Pro práci byly použity primery *rpLNS2f/rpLNSr2* (Martini *et al.*, 2007). Reakční směs pro PCR reakci byla připravena ve sterilním boxu za použití sterilních pomůcek. Nejprve byla do 1,5ml mikrozkušavky připravena reakční směs sestávající z reakčního pufru, hořčičných iontů, sterilní deionizované vody, deoxyribonukleozidtrifosfátů (dNTPs), primerů a polymerasy (viz. Tab. 2). Tato směs byla následně rozpipetována do třech PCR zkumavek s objemem 0,2 ml. Poté byly do prvních dvou 0,2ml zkumavek přidány pozitivní vzorky a do poslední zkumavky přidána sterilní deionizovaná voda, která sloužila jako blank.

Zkumavky s reakční směsí a vzorkem nebo vodou byly promíchány pomocí vortexu, stočeny na stolní centrifuze a umístěny do termocykléru, kde proběhla polymerázové řetězová reakce dle předem definovaných podmínek (viz. Tab. 3).

Tab. 2: Rozpis reakční směsi pro PCR s primery *rpLNS3f/rpLNSr2*.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test
Pufr	10 x	1 x	2,5 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	2,5 mmol/l	2,5 µl
Voda			11 µl
dNTPs	1 mmol/l	200 µmol/l	5 µl
Primer <i>rpLNS2f</i>	20 pmol/µl	0,3 µmol/l	0,375 µl
Primer <i>rpLNSr2</i>	20 pmol/µl	0,3 µmol/l	0,375 µl
RedTaq polymerasa	1 U/µl	1,25 U/reakce	1,25 µl
Objem reakční směsi	23 µl		
Objem vzorku	2 µl		
Celkový objem reakce	25 µl		

Sekvence primerů rpLNS3f/rpLNSr2 (Martini *et al.*, 2007):

rpLNS2f (5'-GTG CTG AAG CTA ATT TAT TG-3')

rpLNS2r (5'-CAA TAT GGC TAG TTC TTT TT-3')

Tab. 3: Časový a teplotní profil PCR reakce.

95 °C 11 min	
94 °C 15 s	
54 °C 15 s	40 cyklů
72 °C 20 s	
72 °C 8 min	

4.3.2 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu

Výsledek polymerázové řetězové reakce byl vyhodnocen na 1% agarózovém gelu, který poté sloužil pro izolaci PCR produktu.

Nejprve byl připraven 1 % agarózový gel smícháním a následným rozvařením v mikrovlnné troubě 1 g agarózy a 100 ml pufru TAE 1x. Bylo odebráno 45 ml připraveného gelu. Odebraný gel byl ochlazen na cca 60 °C, byly do něj přidány 2 µl ethidium bromidu (koncentrace 10 mg/1 ml), a poté byl gel vylit do vaničky. Po půl hodině byl gel přenesen do elektroforetické vaničky a převrstven pufrům TAE 1x po rysku.

Do první jamky ztuhlého agarózového gelu bylo nanášeno 5 µl standardu molekulové váhy (100 bp ladder DNA) a do následujících jamek po 5 µl PCR produktů (včetně blanku). Elektroforéza byla spuštěna na půl hodiny při 70 V. Po doběhnutí elektroforézy byl pomocí UV transluminátoru vyhodnocen výsledek.

4.3.3 Purifikace PCR produktu

Z agarózového gelu byla následně izolována DNA fytoplazmy podle pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit dle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Nejdříve byla pomocí sterilního skalpelu pod UV transluminátorem z 1% agarózového gelu vyříznuta část obsahující PCR produkt. Vyříznutý gel byl umístěn do 1,5ml mikrozkušavky a byla zjištěna jeho hmotnost. Do téže zkumavky byl přidán pufr QG odpovídající trojnásobku hmotnosti vyříznutého gelu (1 μ l ~ 1 μ g). Mikrozkušavka s vyříznutým gelem a QG pufrem byla inkubována 10 min na vodní lázni při 50 °C. Během inkubace byla každé 2-3 minuty mikrozkušavka vortexována, aby se gel s DNA lépe rozpustil. Po úplném rozpuštění gelu bylo zkontrolováno, zda barva směsi je žlutá, stejně jako QG pufr bez rozpuštěného gelu. Ke vzorku byl přidán isopropanol ekvivalentní k hmotnosti vyříznutého gelu (1 μ l ~ 1 μ g) a obsah zkumavky byl promíchán. QIAquick kolonka byla umístěna do 2ml sběrné zkumavky. Na QIAquick kolonku byl napipetován celý vzorek a kolona byla centrifugována 1 min při 5000 rpm. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a kolona umístěna zpět do sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 0,5 ml QG pufru a centrifugováno 1 min při 5000 rpm, čímž došlo k odstranění posledních zbytků agarózy. Na kolonku bylo přidáno 0,75 ml PE pufru, 1 min centrifugováno při 5000 rpm, čímž došlo k promytí kolony. Opět byl vylit obsah sběrné zkumavky a kolona ve sběrné zkumavce byla opět centrifugována 1 min při 13000 rpm. QIAquick kolonku byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Pro eluci DNA bylo přidáno 50 μ l EB pufru na střed membrány QIAquick kolonky a centrifugováno 1 min při 13000 rpm.

Přečištěný PCR produkt byl dále ligován do pGem-T plazmidu (pGEM-T Vector Systém, Promega, USA) dle modifikovaného protokolu výrobce.

4.3.4 Ligace PCR produktu

PCR produkt, který byl vyhodnocen pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu a izolován z tohoto gelu, byl ligován do pGem-T plazmidu (pGEM-T Vector Systém, Promega, USA) dle modifikovaného protokolu výrobce.

Do 0,2ml mikrozkušavky bylo napipetováno 5 μ l ligačního pufru, 1 μ l T4 DNA ligasy, 0,5 μ l pGem-T plazmidu a 3,5 μ l přečištěného PCR produktu. Ligace probíhala přes noc při 4 °C.

4.3.5 Transformace bakterií *E. coli*

Pro namnožení rekombinantního plazmidu pGem-T byly použity komplementární bakteriální buňky JM109. Transformace proběhla teplotním šokem dle protokolu výrobce.

Do 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno 75 μ l kompetentních buněk a 5 μ l ligovaného produktu. Směs byla inkubována 20 min na ledu. Poté byla směs vystavena teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a přenesena zpět na led. Po 2 minutách bylo přidáno 850 μ l živného SOC média a vzorky byly promíchávány na třepačce 1,5 hod při 37 °C. Směs byla zkoncentrována centrifugací při 4000 rpm po dobu 2 min, a poté byl odstraněn supernatant. Pelet byl resuspendován v 50 μ l kultivačního média. Bakteriální suspenze byla následně rozetřena na povrch LB média s přidavkem ampicilinu (100 μ g ampicilinu na 1 ml média), X – Gal a IPTG (X – Gal a IPTG se do kultivačního média přidávají k vizualizaci úspěšného proběhnutí transformace a vnesení vektoru do bakterií). Buňky byly inkubovány při 37 °C přes noc v termostatu.

Druhý den byly bílé bakteriální kolonie přeinkulovány na čerstvé LB médium obsahující ampicilin a opět inkubovány přes noc při 37 °C. Na povrchu média v kultivační misce narostly transformované bakteriální kolonie bílé a modré barvy.

Skríníng pozitivních (bílých) kolonií byl proveden pomocí PCR reakce s využitím primerů M13f a M13r, čímž byla detekována velikost výsledného PCR produktu. Reakční směs byla připravena dle rozpisu v Tab. 4. PCR reakce probíhala dle časového a teplotního profilu v Tab. 3. Jako vzorek byly použity testované kolonie *E. coli*. Jako blank byla použita sterilní deionizovaná voda o objemu 5 μ l.

Tab. 4: Rozpis reakční směsi pro PCR s primery M13.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test
Pufr	10 x	1 x	2 μ l
MgCl ₂	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,2 μ l
Voda			7,8 μ l
Nukleotidy	1 mmol/l	400 μ mol/l	8 μ l
Primer M13f	20 pmol/ μ l	0,4 μ mol/l	0,4 μ l
Primer M13r	20 pmol/ μ l	0,4 μ mol/l	0,4 μ l
RedTaq polymerasa	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,2 μ l
Objem reakční směsi	20 μ l		
Objem vzorku	0 μ l		
Celkový objem reakce	20 μ l		

Sekvence primerů M13r/M13f (Invitrogen, 1999):

M13f (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3')

M13r (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3')

Přítomnost PCR produktu byla vyhodnocena gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Z pozitivních kolonií byly vytvořeny konzervy, které slouží k dlouhodobému uchovávání rekombinantních bakteriálních klonů.

Bakterie byly kultivovány v tekutém LB/Amp médiu za stálého třepání při 37 °C přes noc. Druhý den bylo 850 µl bakteriální suspenze přeneseno do sterilní mikrozukmavky, do které bylo poté přidáno ještě 150 µl glycerolu (do konečné koncentrace 15 %). Konzervy byly uloženy v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C.

4.3.6 Izolace plazmidu

Pro následující práci bylo nutné z transformovaných bakterií izolovat plazmid s vloženou sekvencí fytoplazmy. Izolace byla provedena pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu dle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Do 2ml mikrozukmavky bylo odebráno 1,5 ml transformovaných *E. Coli* v LB médiu a následně centrifugováno 3 min při 6000 rpm. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a buňky byly resuspendovány ve 250 µl pufru P1. Bylo přidáno 250 µl pufru P2 a okamžitě promícháno převrácením zkumavky (15 krát). Bylo přidáno 350 µl pufru N3 a ihned promícháno převrácením zkumavky (10 krát). Suspenze byla centrifugována 10 min při 13000 rpm. Supernatant byl přepipetován na QIAprep Spin kolonu. Kolona byla centrifugována 60 s při 13000 rpm a filtrát odstraněn. Kolona byla promyta přidáním 0,5 ml pufru PB, centrifugována 60 s při 13000 rpm. Kolona byla promyta přidáním 0,75 ml pufru PE, centrifugována 60 s při 13000 rpm. Kolona byla centrifugována další minutu, čímž byl odstraněn zbytkový promývací pufr. QIAprep Spin kolona byla umístěna do čisté 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a do jejího středu bylo napipetováno 50 µl pufru EB, který z kolony uvolnil izolovanou DNA. Kolona s EB pufrem byla ponechána minutu stát a poté byla 1 min centrifugována při 13000 rpm.

Po izolaci plazmidu bylo provedeno měření koncentrace a čistoty pomocí Nanodropu a následně byl stanoven počet kopií templátu v 1 μ l vzorku pomocí vzorce:

$$\text{počet kopií DNA} = (\text{naměřená koncentrace plazmidu [ng/}\mu\text{l]} \times 6,022 \cdot 10^{23}) / (\text{počet bazí klonovaného úseku} \times 1 \cdot 10^9 \times 650)$$

Pozn. Vzorec pro výpočet byl získán z webového odkazu:

<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>

Po zjištění počtu kopií templátu ve vzorcích byla vytvořena zředovací řada ($6,87 \cdot 10^{10}$ – $6,87 \cdot 10^1$ kopií v 1 μ l vzorku), která sloužila jako základ pro vytvoření kalibrační křivky metodou real-time PCR.

4.4 Absolutní a relativní stanovení koncentrace ESFY ve vzorcích

Pro absolutní stanovení počtu kopií DNA fytoplazmy v odebraných vzorcích byla vytvořena kalibrační křivka metodou real-time PCR pro primery rpLNS2f/rpLNSr2 ($6,87 \cdot 10^9$ – $6,87 \cdot 10^2$ kopií v 1 μ l vzorku) a fU5/rU3 (10^{11} – 10^3 kopií v 1 μ l vzorku, pozn. standard pro vytvoření kalibrační křivky byl získán od vedoucího práce). Poté byla provedena kvantitativní PCR s odebranými vzorky (pozn. před provedením real-time PCR s primery fU5/rU3 byly všechny vzorky podrobeny nested PCR a 1000x naředěny). Vyhodnocení bylo provedeno programem Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

Pro relativní stanovení počtu kopií DNA fytoplazmy v odebraných vzorcích byla použita metoda real-time PCR s primery rpLNS2f/rpLNSr2, fU5/rU3 a fAT/rPRUS. Jako standard pro práci byl zvolen vzorek číslo 3454. Výsledky relativního stanovení byly vyhodnoceny pomocí programu Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

4.4.1 Nested PCR

Postup práce při nested PCR byl stejný jako u klasické PCR. Rozdíl byl v tom, že nested PCR probíhala dvojstupňově. Nejprve byla připravena reakční směs se vzorky izolované DNA pro první stupeň reakce (viz. Tab. 5) a byla provedena PCR reakce dle definovaných podmínek pro první pár primerů (viz. Tab. 6).

Poté byla připravena reakční směs pro druhý stupeň (viz. Tab. 5), jako vzorky byly použity 40x naředěné PCR produkty z prvního stupně, a dále proběhla PCR reakce dle časového a teplotního profilu v Tab. 7. Pro první stupeň byly použity primery F1/R0, pro druhý stupeň primery fU5/rU3.

Tab. 5: Rozpis reakční směsi pro nested PCR s primery F1/R0 a fU5/rU3.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1. stupeň	2. stupeň
			Pipetuj 1 test	Pipetuj 1 test
Pufr	10 x	1 x	2 µl	2,5 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,2 µl	1,5 µl
Voda			11,3 µl	14,875 µl
dNTPs	1 mmol/l	100 µmol/l	2 µl	2,5 µl
Primer f	20 pmol/ml	25 µmol/l	0,25 µl	0,3125 µl
Primer r	20 pmol/ml	25 µmol/l	0,25 µl	0,3125 µl
Red Taq polymerasa	1 U/ml	1 U/reakce	1 µl	1 µl
Objem reakční směsi			18 µl	23 µl
Objem vzorku			2 µl	2 µl
Celkový objem reakce			20 µl	25 µl

Sekvence primerů F1/R0 (Davis *et Lee*, 1993; Lee *et al.*, 1993):

F1 (5'-AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG-3')

R0 (5'-GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C-3')

Tab. 6: Časový a teplotní profil nested PCR reakce pro primery F1/R0 – první stupeň.

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

Tab. 7: Časový a teplotní profil nested PCR reakce pro primery fU5/rU3 – druhý stupeň.

94 °C 2 min	
94 °C 1 min	
55 °C 1 min	35 cyklů
72 °C 1 min	
72 °C 10 min	

4.4.2 Real-time PCR

Pro práci byly použity primery rpLNS2f/rpLNSr2 (Martini *et al.*, 2007), fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995) a fAT/rPRUS (Smart *et al.*, 1996). Reakční směs pro real-time PCR byla připravena ve sterilním boxu s použitím sterilních pomůcek. Nejprve byla do 1,5ml mikrozkušavky připravena reakční směs sestávající z reakčního pufru, hořčnatých iontů, sterilní deionizované vody, deoxyribonukleozidtrifosfátů (dNTPs), primerů, SYBR Greenu a polymerasy (viz. Tab. 8, 9). Tato směs byla následně rozpipetována do průhledných PCR zkumavek s objemem 0,2 ml. Poté byly do zkumavek přidány vzorky a do poslední zkumavky přidána sterilní deionizovaná voda, která sloužila jako blank.

Zkumavky s reakční směsí a vzorkem nebo vodou byly promíchány pomocí vortexu, stočeny na stolní centrifuze a umístěny do termocykléru, kde proběhla real-time PCR dle daných podmínek pro každý pár primerů (viz. Tab. 10, 11).

Tab. 8: Rozpis reakční směsi pro real-time PCR s primery rpLNS3f/rpLNSr2.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test
Pufř	5 x	1 x	5 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5 µl
Voda			11 µl
dNTPs	1 mmol/l	200 mmol/l	5 µl
Primer rpLNS2f	20 pmol/ml	0,3 mmol/l	0,375 µl
Primer rpLNSr2	20 pmol/ml	0,3 mmol/l	0,375 µl
SYBR Green			1 µl
GoTaq polymerasa	5 U/ml	1 U/reakce	0,2 µl
Objem reakční směsi	23 µl		
Objem vzorku	2 µl		
Celkový objem reakce	25 µl		

Tab. 9: Rozpis reakční směsi pro real-time PCR s primery fU5/rU3 a fAT/rPRUS.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test
Pufr	5 x	1 x	5 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5 µl
Voda			6,8 µl
dNTPs	1 mmol/l	200 mmol/l	5 µl
Primer fU5	20 pmol/ml	0,2 mmol/l	0,25 µl
Primer rU3	20 pmol/ml	0,2 mmol/l	0,25 µl
SYBR Green			1 µl
GoTaq polymerasa	5 U/ml	1 U/reakce	0,2 µl
Objem reakční směsi	20 µl		
Objem vzorku	5 µl		
Celkový objem reakce	25 µl		

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

fU5 (5'-CGG CAA TGG AGG AAA CT-3')

rU3 (5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA -3')

Sekvence primerů fAT/rPRUS (Smart *et al.*, 1996):

fAT (5'-CAT CAT TTA GTT GGG CAC TT-3')

rPRUS (5'-GGC CCA AGC CAT TAT TGA TT-3')

Tab. 10: Časový a teplotní profil real-time PCR reakce pro primery rpLNS3f/rpLNSr2.

95 °C 2 min	
94 °C 15 s	
54 °C 15 s	40 cyklů
72 °C 20 s	
72 °C 8 min	

Tab. 11: Časový a teplotní profil real-time PCR reakce pro primery fU5/rU3 a fAT/rPRUS.

95 °C 2 min	
95 °C 1 min	
55 °C 1 min	35 cyklů
72 °C 1 min	
72 °C 8 min	

Po provedení real-time PCR byl pomocí softwaru Microsoft Excel proveden F-test, kterým byl statisticky vyhodnocen rozdíl mezi vzorky odebranými z příznakových a bezpříznakových stromů meruněk.

4.5 Přístrojové vybavení laboratoře

Horizontální elektroforéza AGAGEL STANDARD

Mikrovlnná trouba

Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI, Labnet International, Inc.

Nanodrop NANODROP 1000 SPECTROPHOTOMETER, Thermo Scientific
Program Microsoft Excel (součást softwaru Microsoft Office 2007), Microsoft

Software Rotor-Gene 6, Corbett Research

Sterilní box TELSTAR PV-100, Telstar

Termocyklér PTC-100, MJ Research

Termocyklér Rotor-Gene RG-3000A, Corbett Research

Termostat SM-30 CONTROL, Edmund Bühler GmbH

UV transluminátor G:BOX, Syngene

UV transluminátor MACRO VUE UVis-20, Hofer

Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.

Vortex MS1 MINISHAKER, IKA®

Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Pack P 25, Biometra

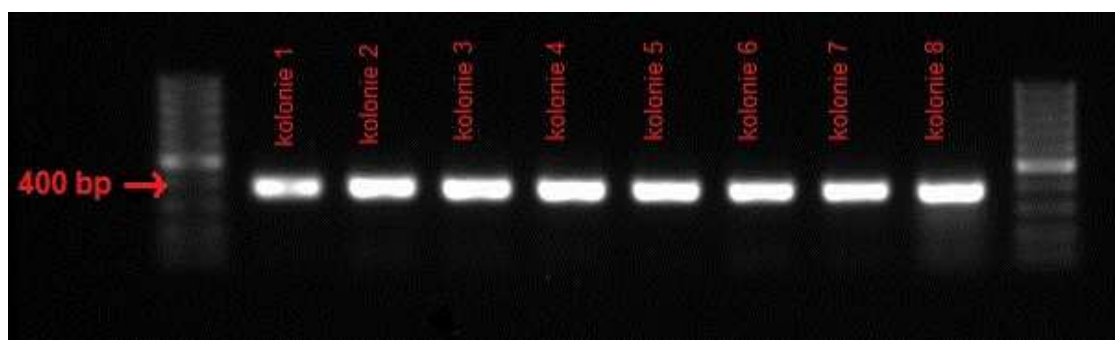
5 Výsledky

5.1 Příprava standardu a kalibračních křivek pro kvantitativní PCR

Experimentální část byla zahájena přípravou standardu rpLNS3f/rpLNSr2. Nejprve byla amplifikována DNA sekvence fytoplazmy obsažená v pozitivním vzorku (č. 2581). PCR produkt byl vyhodnocen na agarózovém gelu, ze kterého byl následně izolován. Tento produkt byl ligován do pGem-T plazmidu, který byl pomocí teplotního šoku vložen do bakterií *E. coli*.

Pro ověření správnosti transformace bakterií byla provedena PCR reakce (jako vzorek byly použity transformované bakterie) a PCR produkt byl vyhodnocen na 1% agarózovém gelu (viz. Obr. 1). Elektroforézou byl získán produkt o velikosti cca 400 bp, čímž bylo dokázáno, že DNA sekvence byla skutečně vložena do plazmidu a vložený segment má očekávanou velikost cca 150 bp (přesně 153 bp).

Obr. 1: Vyhodnocení transformace bakterií na 1% agarózovém gelu.



Poté byl plazmid izolován z bakterií pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu a byla změřena jeho čistota, stanovena koncentrace a vypočten počet kopií PCR produktu (viz. Tab. 12).

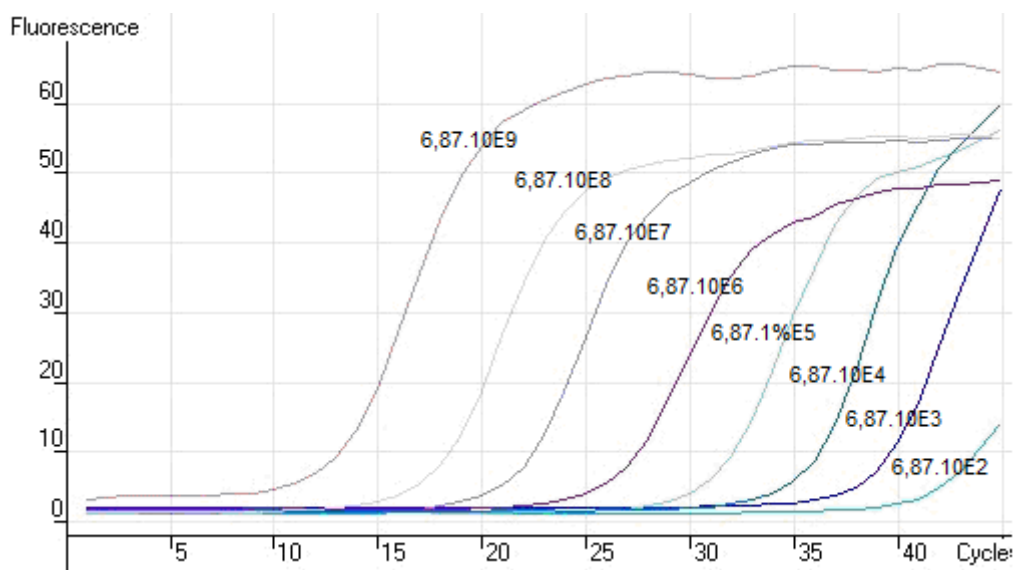
Tab. 12: Výsledek měření koncentrace a čistoty izolovaného plazmidu na Nanodropu.

Čistota (absorbance 260/280)	Koncentrace plazmidu [ng/μl]	Počet kopií PCR produktu v 1 μl vzorku
1,77	237,4	$6,87 \cdot 10^{10}$

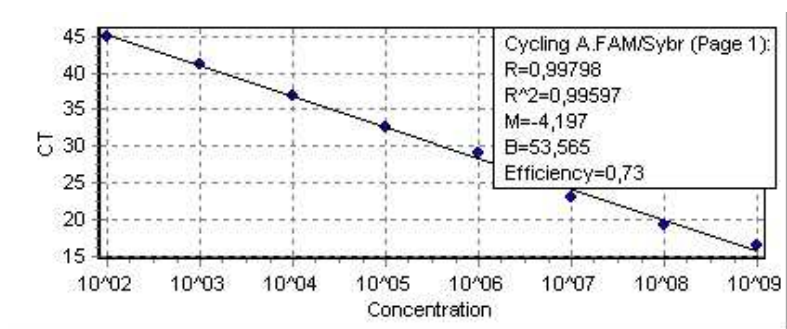
Protože čistota izolovaného plazmidu (absorbance 260/280) byla dostatečná, bylo možné s ním dále pracovat. Byla vytvořena zředovací řada standardu rpLNS3f/rpLNSr2 ($6,87 \cdot 10^{10}$ – $6,87 \cdot 10^1$ kopií v 1 μl vzorku) a provedena real-time PCR s primery rpLNS3f/rpLNSr2, aby byla získána kalibrační křivka plazmidu pro kvantifikaci fytoplazmy pomocí primerů rpLNS3f/rpLNSr2 v odebraných vzorcích (viz. Graf 1 a 2).

Dále byla vytvořena zředovací řada standardu fU5/rU3 získaného od vedoucího práce (10^{11} – 10^3 kopií v 1 μl vzorku) a provedena real-time PCR s primery fU5/rU3, aby byla získána kalibrační křivka plazmidu pro kvantifikaci fytoplazmy pomocí primerů fU5/rU3 v odebraných vzorcích (viz. Graf 3 a 4).

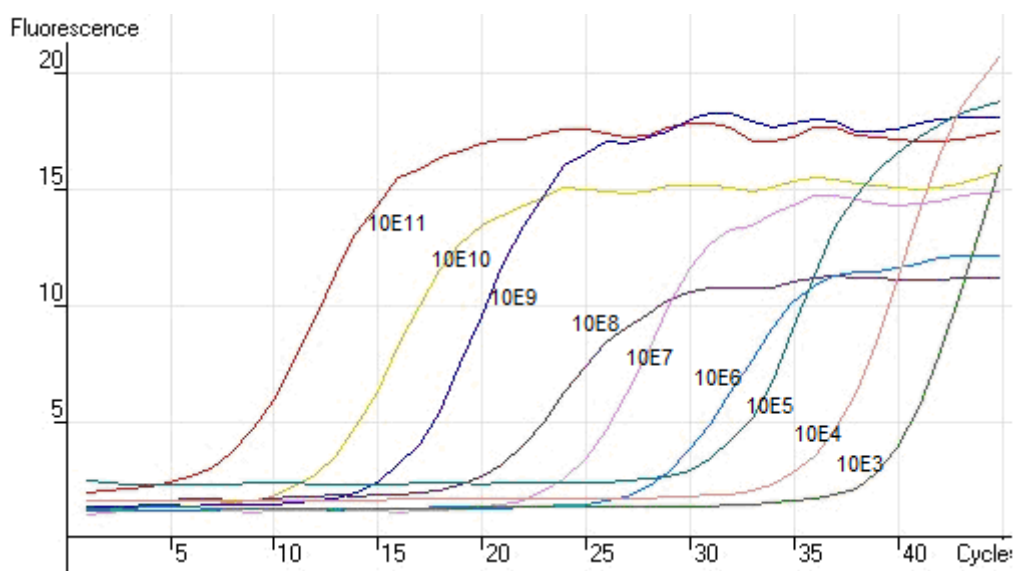
Graf 1: Detekce fluorescence kalibrační křivky v průběhu real-time PCR pro primery rpLNS3f/rpLNSr2.



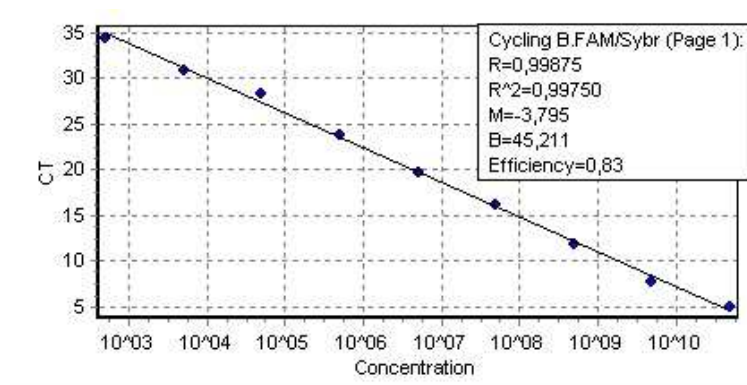
Graf 2: Kalibrační křivka pro primery rpLNS3f/rpLNSr2.



Graf 3: Detekce fluorescence kalibrační křivky v průběhu real-time PCR pro primery fU5/rU3.



Graf 4: Kalibrační křivka pro primery fU5/rU3.



5.2 Kvantitativní stanovení fytoplazmy v příznakových a bezpříznakových stromech

Pro stanovení absolutní koncentrace *Candidatus* Phytoplasma prunorum ve vzorcích odebraných z příznakových a bezpříznakových stromů meruněk (vzorky č. 3431-3462) byly použity primery rpLNS3f/rpLNSr2 a fU5/rU3 a výsledky byly vyhodnoceny podle daných kalibračních křivek programem Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

Pro stanovení relativní koncentrace *Candidatus* Phytoplasma prunorum ve vzorcích odebraných z příznakových a bezpříznakových stromů meruněk (vzorky č. 3431-3462) byly použity primery rpLNS3f/rpLNSr2, fU5/rU3 a fAT/rPRUS a výsledky byly vyhodnoceny podle vybraného standardu (vzorek č. 3454) programem Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

5.2.1 Stanovení absolutní a relativní koncentrace ESFY pomocí primerů *rpLNS3f/rpLNSr2*

Kvantitativní PCR při použití primerů rpLNS3f/rpLNSr2 nepotvrdila rozdíl v koncentracích fytoplazem v sítkovicích příznakových a nepříznakových stromů (viz. Tab. 13). Pozitivní reakce byla získána pouze u dvanácti (z toho 7 příznakových a 5 bezpříznakových) z celkových čtyřiceti vzorků. *Absolutní stanovení* koncentrace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v analyzovaných vzorcích ukázalo, že u bezpříznakových stromů se počet kopií DNA fytoplazmy pohyboval v rozmezí $3,38 \cdot 10^3$ – $9,52 \cdot 10^5$ ve 2 μ l vzorku, u příznakových stromů v rozmezí $2,26 \cdot 10^1$ – $1,07 \cdot 10^6$ ve 2 μ l vzorku. *Relativní stanovení* koncentrace ESFY ve vzorcích zhruba odpovídá absolutnímu stanovení.

5.2.2 Stanovení absolutní a relativní koncentrace ESFY pomocí primerů *fU5/rU3*

Před provedením real-time PCR s primery fU5/rU3 byly všechny vzorky předamplifikovány pomocí primerů F1/R0 a fU5/rU3 a 1000x naředěny. Kvantitativní PCR při použití primerů fU5/rU3 nepotvrdila rozdíl v koncentracích fytoplazem

v sítkovicích příznakových a nepříznakových stromů (viz. Tab. 14). Pozitivní reakce byla získána pouze u osmadvaceti (z toho 18 příznakových a 10 bezpříznakových) z celkových dvaatřiceti vzorků. *Absolutní stanovení* koncentrace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v analyzovaných vzorcích ukázalo, že u bezpříznakových stromů se počet kopií DNA fytoplazmy pohyboval rozmezí $4,80 \cdot 10^4 - 1,87 \cdot 10^6$, u příznakových stromů v rozmezí $4,00 \cdot 10^3 - 2,20 \cdot 10^6$ ve 2 μ l vzorku. *Relativní stanovení* koncentrace ESFY ve vzorcích zhruba odpovídá absolutnímu stanovení.

Statisticky průkazný rozdíl v koncentracích ESFY v příznakových a bezpříznakových stromech nebyl na hladině 99 % pomocí F-testu prokázán.

5.2.3 Stanovení relativní koncentrace ESFY pomocí primerů fAT/rPRUS

Dále byla koncentrace ESFY stanovena kvantitativní real-time PCR za použití primerů fAT/rPRUS. Získané výsledky byly vyhodnoceny na úrovni relativního stanovení (viz. Tab. 15). Jako standard pro toto stanovení byl použit vzorek číslo 3454, tak jako u předešlých stanovení. I pomocí těchto primerů nebyl zjištěn rozdíl v koncentraci fytoplazmy u příznakových a bezpříznakových stromů. Jako nejvíce pozitivní byl vyhodnocen vzorek číslo 3434, který byl odebrán z bezpříznakového stromu a naopak na posledních místech se vyskytují vzorky pocházející ze stromů příznakových.

Statisticky průkazný rozdíl v koncentracích ESFY v příznakových a bezpříznakových stromech nebyl na hladině 99 % pomocí F-testu prokázán.

Tab. 13: Sestupné řazení vzorkovaných stromů meruněk dle relativního stanovení koncentrace ESFY v sítkovicích metodou real-time PCR při použití primerů rpLNS3f/rpLNSr2.

Vzorek číslo	Symptomy	Absolutní stanovení obsahu ESFY při použití primerů rpLNS3f/rpLNSr2	Relativní stanovení obsahu ESFY při použití primerů rpLNS3f/rpLNSr2 vztahené ke vzorku č. 3454 [%]
3461	bez symptomů	$9,52 \cdot 10^5$	96900
3458	chlorotická svinutka	$1,07 \cdot 10^6$	89000
3459	chlorotická svinutka	$1,67 \cdot 10^5$	32100
3462	chlorotická svinutka	$1,20 \cdot 10^5$	27100
3445	příznakový	$5,47 \cdot 10^4$	19300
3448	bez symptomů	$1,62 \cdot 10^5$	11600
3444	bez symptomů	$3,18 \cdot 10^4$	6970
3452	bez symptomů	$1,95 \cdot 10^3$	2040
3451	bez symptomů	$3,38 \cdot 10^3$	1330
3450	příznakový	$3,12 \cdot 10^3$	389
3440	příznakový	$5,90 \cdot 10^1$	114
3454	chlorotická svinutka	$2,26 \cdot 10^1$	100
3433	hnědnutí dřeva	0	0
3460	bez symptomů	0	0
3447	příznakový	0	0
3432	příznakový	0	0
3446	bez symptomů	0	0
3435	příznakový	0	0
3436	bez symptomů	0	0
3438	příznakový	0	0
3443	příznakový	0	0
3437	příznakový	0	0
3455	silná chlorotická svinutka	0	0
3439	příznakový	0	0
3453	bez symptomů	0	0
3449	příznakový	0	0
3441	příznakový	0	0
3431	příznakový	0	0
3457	bez symptomů	0	0
3434	bez symptomů	0	0
3442	bez symptomů	0	0
3456	chlorotická svinutka	0	0

Tab. 14: Sestupné řazení vzorkovaných stromů meruněk dle relativního stanovení koncentrace ESFY v sítkovicích metodou real-time PCR při použití primerů fU5/rU3

Vzorek číslo	Symptomy	Absolutní stanovení obsahu ESFY při použití primerů fU5/rU3	Relativní stanovení obsahu ESFY při použití primerů fU5/rU3 vztahené ke vzorku č. 3454 [%]
3433	hnědnutí dřeva	$2,12 \cdot 10^6$	2070,00
3434	bez symptomů	$1,87 \cdot 10^6$	1560,00
3446	bez symptomů	$1,18 \cdot 10^6$	1490,00
3462	chlorotická svinutka	$2,20 \cdot 10^6$	1420,00
3436	bez symptomů	$1,48 \cdot 10^6$	1300,00
3459	chlorotická svinutka	$6,57 \cdot 10^5$	708,00
3432	příznakový	$4,74 \cdot 10^5$	511,00
3461	bez symptomů	$2,59 \cdot 10^5$	424,00
3460	bez symptomů	$3,08 \cdot 10^5$	405,00
3438	příznakový	$2,65 \cdot 10^5$	321,00
3458	chlorotická svinutka	$1,57 \cdot 10^5$	306,00
3447	příznakový	$2,40 \cdot 10^5$	292,00
3453	bez symptomů	$2,03 \cdot 10^5$	292,00
3452	bez symptomů	$2,19 \cdot 10^5$	266,00
3443	příznakový	$1,62 \cdot 10^5$	254,00
3440	příznakový	$2,07 \cdot 10^5$	242,00
3441	příznakový	$1,40 \cdot 10^5$	242,00
3445	příznakový	0	211,00
3437	příznakový	$1,48 \cdot 10^5$	183,00
3442	bez symptomů	$7,37 \cdot 10^4$	159,00
3450	příznakový	$8,97 \cdot 10^4$	159,00
3444	bez symptomů	$9,31 \cdot 10^4$	152,00
3454	chlorotická svinutka	$6,62 \cdot 10^4$	100,00
3451	bez symptomů	$4,80 \cdot 10^4$	95,40
3455	silná chlorotická svinutka	$1,60 \cdot 10^4$	45,30
3439	příznakový	$1,51 \cdot 10^4$	22,50
3456	chlorotická svinutka	$4,00 \cdot 10^3$	16,20
3435	příznakový	$4,20 \cdot 10^3$	10,20
3449	příznakový	$4,58 \cdot 10^3$	8,07
3457	bez symptomů	0	3,18
3431	příznakový	0	2,52
3448	bez symptomů	0	2,29

Tab. 15: Sestupné řazení vzorkovaných stromů meruněk dle relativního stanovení koncentrace ESFY v sítkovicích metodou real-time PCR při použití primerů fAT/rPRUS.

Vzorek číslo	Symptomy	Relativní stanovení obsahu ESFY při použití primerů fAT/rPRUS vztažené ke vzorku č. 3454 [%]
3434	bez symptomů	159,00
3432	příznakový	147,00
3435	příznakový	147,00
3431	příznakový	142,00
3443	příznakový	137,00
3462	chlorotická svinutka	135,00
3449	příznakový	128,00
3438	příznakový	124,00
3447	příznakový	121,00
3444	bez symptomů	120,00
3452	bez symptomů	118,00
3453	bez symptomů	118,00
3441	příznakový	117,00
3445	příznakový	117,00
3446	bez symptomů	114,00
3450	příznakový	111,00
3458	chlorotická svinutka	109,00
3460	bez symptomů	108,00
3456	chlorotická svinutka	105,00
3457	bez symptomů	105,00
3454	chlorotická svinutka	100,00
3451	bez symptomů	90,20
3459	chlorotická svinutka	85,80
3437	příznakový	70,10
3461	bez symptomů	69,80
3455	silná chlorotická svinutka	69,00
3442	bez symptomů	68,80
3440	příznakový	65,70
3436	bez symptomů	63,50
3448	bez symptomů	63,50
3439	příznakový	63,20
3433	hnědnutí dřeva	60,40

6 Diskuze

V této práci jsem pomocí real-time PCR prováděla detekci a kvantifikaci *Candidatus Phytoplasma prunorum* ve vzorcích pocházejících z lýka testovaných meruněk s důrazem na příznakové a bezpříznakové rostliny. Účelem bylo vybrat vhodný postup a primery pro detekci a kvantifikaci této fytoplazmy a dále stanovit koncentraci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v příznakových a bezpříznakových rostlinách.

Logicky jsem předpokládala, že ve vzorcích odebraných z příznakových stromů bude koncentrace *Candidatus Phytoplasma prunorum* vyšší než ve vzorcích odebraných z bezpříznakových stromů. Tento předpoklad jsem ovšem nepotvrdila, protože se ukázalo, že korelace mezi příznaky infikovaných stromů a koncentrací fytoplazmy v jejich sítkovicích v souboru mých vzorků neexistuje.

Při použití primerů rpLNS3f/rpLNSr2 se relativní stanovení koncentrace ESFY pohybuje v rozmezí od 100 % do 96900 %. U primerů fU5/rU3 je rozpětí relativní koncentrace fytoplazmy v sítkovicích u bezpříznakových stromů menší, a to od 2 % do 1560 %. Absolutní stanovení počtu kopií u příznakových rostlin pomocí primerů rpLNS3f/rpLNSr2 a fU5/rU3 se řádově shoduje s absolutním stanovením pomocí primerů AP5/AP4 a AP3/AP4, které provedli Jarausch *et al.* (2004). Pomocí primerů fAT/rPRUS bylo dokonce vyhodnoceno, že vzorek s nejvyšší koncentrací fytoplazmy v sítkovicích byl vzorek odebraný z bezpříznakového stromu. Procentuálně se koncentrace ESFY u bezpříznakových stromů za použití primerů fAT/rPRUS pohybuje v rozmezí 64 – 159 %. Standardem pro všechna relativní stanovení byl použit vzorek číslo 3454, který byl odebrán k příznakového stromu, který vykazoval chlorotickou svinutku a prosychání.

Vysokou variabilitu koncentrace ESFY u příznakových a bezpříznakových stromů stanovili i Genini a Ramel (2004) a to konkrétně u odrůdy meruňky Luizet. Při testování odebraných vzorků pomocí metody PCR bylo jako pozitivní stanoveno 96 % symptomatických a 84 % asymptomatických stromů a tedy nezjistili korelaci mezi příznaky a koncentrací fytoplazmy. U řady meruněk a jiných stromů rodu *Prunus* byla pozitivita prokázána pouze u příznakových stromů (v 64 % a 67 %). U bezpříznakových stromů byla pozitivita metodou PCR vyloučena (Genini *et Ramel*, 2004).

Nebyla prokázána souvislost mezi příznaky a koncentrací *Candidatus Phytoplasma prunorum* ve vzorcích odebraných z příznakových a bezpříznakových stromů meruněk. Nicméně výsledky mohly být ovlivněny již při odběru vzorků. Fytoplazmy osidlují stromy mozaikovitě, takže je možné, že při odběru 3 – 4cm segmentu postranního výhonu byl vybrán úsek tzv. nereprezentativní, čili s příliš nízkou nebo naopak příliš vysokou koncentrací fytoplazmy. Vzhledem k charakteru rozšíření fytoplazmy v rámci stromu je tato hypotéza velmi pravděpodobná. Distribuce fytoplazem ve stromech ve vztahu ke vnějším příznakům by měla být předmětem dalšího zkoumání. Dále mohly být výsledky ovlivněny výtěžností izolace DNA z odebraných vzorků lýka, protože izolace DNA ze dřevin je obtížná. V neposlední řadě je ve vzorcích izolované DNA možná přítomnost PCR-inhibičních látek, což je u dřevin častý jev.

7 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem vypracovala literární rešerši na téma detekce a kvantifikace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce. V experimentální části jsem se zabývala výběrem vhodného postupu a primerů pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci a stanovením relativní koncentrace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v různých hostitelích s důrazem na příznakové a bezpříznakové stromy meruněk.

Pro detekci a identifikaci *Candidatus Phytoplasma Prunorum* jsem použila primery rpLNS3f/rpLNSr2, fU5/rU3 a fAT/rPRUS, přičemž jako nejspolehlivější se jevíly primery fAT/rPRUS. Výsledky relativního stanovení koncentrace fytoplazmy pro dané primery jsou velice variabilní, z čehož plyne, že nebyl zjištěn rozdíl v koncentraci fytoplazem v sítkovicích příznakových a bezpříznakových stromů meruněk. Důvodem může být to, že fytoplazma není distribuována v rámci stromu rovnoměrně, takže není možné při tak malé vzorkování odebrat zcela průměrný vzorek.

8 Seznam použitých zkratek

ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
bp	pár bází (base pair)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxyribonukleozidtrifosfáty
ESFY	fytoplazma evropské žloutenky peckovin (European stone fruit yellows phytoplasma)
kb	1000 bází
PCR	polamerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
rpm	počet otáček za minutu
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

9 Seznam použité literatury

Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.

Ahrens, U., Seemüller, E. (1994): Detection of mycoplasmalike organisms in declining oaks by polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* 24, 55-63.

Angelini, E., Bianchi, G.L., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo, M. (2007): A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* 68, 613-622.

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.

Barbara, D.J., Morton, A., Clark, M.F., Davies, D.L. (2002): Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Mikrobiology* 148, 157-167.

Berges, R., Rott, M., Seemüller, E. (2000): Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 10, 1145-1152.

Bianco, P.A., Casati, P., Marziliano, N. (2004): Detection of phytoplasmas associated with grapevine flavescence dorée disease using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology* 86, 257-61.

Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Clair, D., Hourdel, J., Jeanneau, A., Sforza, R., Collin, E. (2004): Detection and prophylaxis of Elm Yellows phytoplasma in France. *Investigacion Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 13, 71-80.

Data Sheets on Quarantine Pests. Prepared by CABI and EPPO for the EU. <http://www.eppo.org>.

Davis, R.E., Lee, I.-M. (1993): Cluster-specific polymerase Chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology* 83, 1008-1011.

Dötsch, J., Schoof, E., Rascher, W. (2005): Quantitative TaqMan real-time PCR. *Medical Biomethods Handbook*, 305-313.

Firrao, G., Gobi, E., Locci, R. (1993): Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasmalike organisms. *Phytopathology* 83, 602-607.

Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C. (2005): Universal and groupspecific real-time PCR diagnosis of flavescence doreé (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology* 147, 191–201.

Genini, M., Ramel, M.E. (2004): Distribution of European stone fruit yellows phytoplasma in apricot trees in western switzerland. *Acta Horticulturae* 657, 455-458.

Goodwin, P.H., Xue, B.G., Kuske, C.R., Sears, M.K. (1994): Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasmalike organisms. *Annals of Applied Biology* 124, 27-36.

Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasmalike organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bakteriology* 176, 5244-5254.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.

Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1175–84.

Invitrogen (1999): Instruction manual of original TA cloning kit.

Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bové, J.M. (1994): Differentiation of mycoplasmalike organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2916-2923.

Jarausch, W., Jarausch-Wehrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C., Garnier, M. (2001): Detection and indentification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology* 107, 209–217.

Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., Krczal, G. (2004): Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657, 415–420.

- Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., Krczal, G. (2004): Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657, 415-420.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Jung, H.-Y., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S.-I., Ugaki, M., Kishino, H., Namba, S. (2006): Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *Journal of Bacteriology* 188, 3424–3428.
- Klein, D. (2002): Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257-60.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153-1169.
- 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.
- Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., Chen, T.A. (2002): Production of monoclonal antibodies against Apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology* 108, 81-86.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller E. (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771–776.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups. *Phytopathology* 89, 805-810.
- Martini, M., Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Pastore, M. (2007): A real-time PCR Method for detection and quantification of „*Candidatus* Phytoplasma prunorum“ in its natural hosts. *Bulletin of Insectology* 60, 251-252.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J. & 16 other authors (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: *The Mycoplasmas*, vol. 5. Academic Press, New York, 545–640.
- Németh, M. (1986) *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Akadémiai Kiado, Budapest, 626-633.

Pastore, M., Piccirillo, P., Simone, A.M., Tian, J., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. (2001): Transmission by patch grafting of ESFY phytoplasma to apricot (*prunus armeniaca* l) and japanese plum (*prunus salicina* lindl). *Acta Horticulturae* 2, 339-44.

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., 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.

Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C. (1996): Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 8, 2988–2993.

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.

Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., Martín, M.P. (2005): Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19, 334–340.

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 Mikrobiology* 57, 1855-1867.

Yvon, M., Thébaud, G., Alary, R., Labonne, G. (2009): Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’. *Molecular and Cellular Probes* 23, 227–234.