

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Identifikace a biotypizace fytopatogenů kulturních rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Jana Chalupová</b>
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Mgr. Marek Šebela, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	26. 4. 2011

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 26. 4. 2011

Děkuji především svému vedoucímu diplomové práce prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, veškeré cenné rady a připomínky, které mi poskytl, a také za trpělivost a čas, které mi během této práce věnoval. Také děkuji všem pracovníkům katedry biochemie PřF UP v Olomouci za jejich ochotu kdykoliv pomoci a poradit. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D., z Oddělení fytopatologie a mikrobiologie Katedry botaniky, PřF UP v Olomouci, která mi poskytla odborné informace, materiál a užitečné rady z oblasti biologie a fytopatologie houbových organismů, také paní Drahomíře Vondrákové a Věře Zoubkové a celému Oddělení fytopatologie a mikrobiologie Katedry botaniky, PřF UP v Olomouci, za pomoc při přípravě a pěstování biologického materiálu, rady a zkušenosti. RNDr. Pavlovi Řehulkovi, Ph.D., z Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, bych chtěla poděkovat za možnost provést srovnávací analýzy na hmotnostních spektrometrech 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) a Voyager DE STR (Perseptive Biosystems), a taktéž za velice užitečné a hodnotné rady, informace a zkušenosti. Nakonec mé poděkování patří profesorovi Günterovi Allmaierovi za umožnění pobytu v podobě stáže, která se uskutečnila v rámci Česko-rakouské vědecko-technické spolupráce na Institutu chemických technologií a analytiky Fakulty technické chemie Technické univerzity ve Vídni, kde jsem mohla provádět své analýzy na hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical). Nejen jemu, ale i doktorce Martině Marchetti-Deschmann, Dipl.-Ing. Michaele Helmel a celé jeho vědecké skupině bych chtěla poděkovat za ochotu vždy pomoci a poradit, zvláště pak za hodnotné rady a zkušenosti v oblasti hmotnostní spektrometrie intaktních mikroorganismů, které jsem během svého pobytu získala a mohla využít při experimentech ve své diplomové práci.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Chalupová
Název práce	Identifikace a biotypizace fytopatogenů kulturních rostlin pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	

Tato diplomová práce se zabývá fytopatogeny zemědělsky důležitých rostlin, zvláště pak identifikací obligátních biotrofních patogenů jako jsou peronospor (říše Chromista, řád Peronosporales) a padlí (říše Fungi, řád Erysiphales) pomocí hmotnostní spektrometrie.

Teoretická část této práce se věnuje fytopatogenům, zejména pak zástupcům řádu Peronosporales (peronospor) a Erysiphales (padlí), jejich fylogenezi, biologii, morfologii, životnímu a infekčnímu cyklu. Dále je rozebírána současná diagnostika těchto mikroorganismů, výhody a nevýhody soudobých metod se zaměřením na hmotnostní spektrometrii mikroorganismů, její historii, vývoj a využití. Praktická část se věnuje vývoji alternativního přístupu diagnostiky, který je založen na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii intaktních buněk nebo spor, vyžaduje pouze malé množství biologického materiálu a umožňuje tak rychlé a relativně snadné zpracování a analýzu dat. Většina experimentů, které se věnovaly optimalizačním postupům přípravy vzorku, byla prováděna s plísní salátovou, *Bremia lactucae* a padlí rajčat, *Oidium neolycopersici*. Optimalizace pro MALDI-TOF hmotnostní analýzu intaktních spor zahrnovala výběr vhodné matrice, optimálního složení rozpouštědla, množství vzorku a matrice nanášených na MALDI destičku a výběr techniky nanášení. Byly testovány běžně dostupné MALDI matrice a použity jak samostatně, tak i v kombinaci s definovanými hmotnostními poměry. Trifluoroctová (TFA), mravenčí a octová kyselina atd. byly použity k okyselení roztoku pro extrakci proteinů z povrchu konidií. TFA byla testována v koncentraci 0,1-2,5% (v/v). Byl sledován vliv organických aditiv přítomných v roztoku rozpouštědla matrice. Pomocí těchto postupů byla shledána jako optimální kombinace matric kyseliny ferulové a sinapové rozpuštěných v hmotnostním poměru 1:3 v roztoku acetonitrilu a 2,5% TFA (7:3, v/v). Nejvhodnější nanášení suspenze spor a matrice bylo technikou vysušené kapky s volným odpařením při laboratorní teplotě. Hustota suspenze spor byla stanovena na  $2-5 \times 10^9$  spor/mL, množství nanášené suspenze a matrice na MALDI destičku bylo 1  $\mu$ L. Další experimenty se zaměřily na hodnocení vlivu doby působení roztoku matrice na intaktní spory a výběr vhodného typu MALDI destičky (nerez, na bázi polymeru). Bylo testováno i použití enzymů celulas s cílem narušit buněčnou stěnu a uvolnit tak co nejvíce proteinů z povrchu buněčných stěn spor. Byla zkonstruována databáze peptidových a proteinových profilů, která by měla sloužit pro biotypizaci nových isolátů. Nakonec byl započat vývoj metody k identifikaci fytopatogenů přímo z listu, která by v budoucnu mohla nalézt uplatnění v diagnostice.

Klíčová slova	<i>Bremia lactucae</i> , <i>Oidium neolycopersici</i> , fytopatogen, peronospora, padlí, optimalizace, identifikace, biotypizace, ISMS (hmotnostní spektrometrie intaktních spor)
Počet stran	107
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc.Jana Chalupová
Title	Identification and biotyping of phytopathogens of cultivated plants using mass spectrometry
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	

This diploma thesis deals with phytopathogens which invade agriculturally important plants, namely with mass spectrometric identification of obligate biotrophic pathogens like downy mildews (kingdom Chromista, order Peronosporales) or powdery mildews (kingdom Fungi, order Erysiphales).

The theoretical part of this thesis describes phytopathogens, especially members of the order Peronosporales (downy mildews) and the order Erysiphales (powdery mildews), their phylogeny, biology, morphology, life and infection cycle. Furthermore, the current diagnostics of these microorganisms is discussed including both advantages and disadvantages of recent methods with a focus on history, development and application of mass spectrometric analysis of intact microorganisms.

The experimental part is devoted to the development of an alternative diagnostic approach based on intact cell or spore MALDI-TOF mass spectrometry, which requires only very small amount of biological material and allows fast as well as relatively easy sample processing and data interpretation. Experimental approaches for the mass spectrometric analyses were optimized using *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew, and *Oidium neolycopersici*, cause of tomato powdery mildew. This involved choosing of a proper MALDI matrix compound, looking for the optimal solvent composition and evaluation of different sample preparation techniques. Commonly available MALDI matrices were tested. The matrices were applied individually or in combinations with defined weight ratios. Trifluoroacetic acid (TFA), formic acid, acetic acid etc. were used to provide acidic conditions for the protein extraction from the surface of conidia. TFA was tested in concentrations of 0.1-2.5 % (v/v). The acidic aqueous matrix solution was optionally modified by adding water-miscible organic solvents. The most significant peptide/protein profiles were obtained with ferulic acid and sinapic acid as matrices dissolved in a weight ratio of 1:3 in acetonitrile: 2.5% TFA (7:3, v/v). The most suitable procedure for spores and matrix deposition on the target was using the dried droplet technique followed by evaporation at room temperature. The density of spore suspension was set to  $2.5 \times 10^9$  spores/mL, 1  $\mu$ L of sample and 1  $\mu$ L of matrix were found optimal for the deposition on MALDI target. Further experiments were focused on playing with different times and temperatures of sample exposure to the matrix solution, using different target materials (stainless steel, polymer based). To enhance signals in MALDI-TOF protein profiles, a pre-treatment of cell suspensions with cellulases was successfully introduced. A database of mass spectra representing an archive of protein profiles of the studied phytopathogens was constructed to serve for biotyping (i.e. characterization based on biochemical traits) of field isolates. Finally, the development of method for phytopathogens mass spectrometry identification directly from leaf for future application in diagnostics was started.

Keywords	<i>Bremia lactucae</i> , <i>Oidium neolycopersici</i> , phytopathogen, downy mildews, powdery mildews, optimization, identification, biotyping, ISMS (intact spore mass spectrometry)
Number of pages	107
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

CÍLE PRÁCE .....	7
TEORETICKÁ ČÁST .....	8
1. Původci chorob rostlin .....	9
1.1. Houbové organismy .....	9
1.2. Houboví patogeni rostlin .....	10
1.3. Peronospory.....	12
1.3.1. Fylogenetické vztahy v rámci třídy Peronosporomycetes .....	12
1.3.2. Životní a infekční cyklus peronospor .....	14
1.3.3. Zástupci řádu Peronosporales.....	16
1.4. Padlí .....	21
1.4.1. Fylogenetické aspekty v rámci ř. Erysiphales .....	21
1.4.2. Životní a infekční cyklus padlí .....	21
1.4.3. Zástupci ř. Erysiphales .....	23
2. Metody identifikace rostlinných patogenů .....	31
2.1. Diagnostika na základě symptomů a pomocí srovnávací morfologie .....	31
2.2. Molekulárně biologické metody identifikace fytopatogenů .....	32
2.3. Identifikace a charakterizace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).....	33
2.3.1. Historie v oblasti identifikace a charakterizace pomocí MS .....	34
2.3.1.1. Tvrdé ionizační techniky MS .....	34
2.3.1.2. Měkké ionizační techniky MS .....	34
2.3.1.3. Výhody a nevýhody ESI-MS a MALDI-MS.....	35
2.3.2. MALDI-MS intaktních mikroorganismů .....	36
2.3.2.1. MALDI-TOF spektra biomarkerů .....	36
2.3.2.2. Instrumentace .....	37
2.3.2.3. Vzorek a jeho příprava .....	39
2.3.2.4. Charakterizace MALDI biomarkerů a proteomické přístupy .....	40
2.3.3. Aplikace MALDI-MS při identifikaci intaktních bakterií .....	41
2.3.4. Aplikace MALDI-MS při identifikaci intaktních mikroskopických hub .....	43
2.3.4.1. Proteomické analýzy mikroskopických hub .....	46
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	48
3. Materiál a metody.....	49
3.1. Biologický materiál .....	49
3.2. Chemikálie .....	50
3.2.1. Enzymy a proteiny .....	50
3.2.2. Ostatní chemikálie.....	50
3.3. Materiál a přístrojová technika .....	51
3.4. Software .....	52
3.5. Použité metody .....	52
3.5.1. Pěstování rostlin a kultivace patogenů .....	52
3.5.1.1. Inokulace, udržování patogena a sběr vzorků .....	52
3.5.1.2. Pěstování semenáčků rostlin <i>Lactuca sativa</i> cv. Cobham Green .....	53
3.5.1.3. Pěstování rostlin <i>Lactuca sativa</i> cv. Cobham Green .....	53
3.5.2. MALDI-TOF MS intaktních spor .....	53
3.5.2.1. Příprava suspenze intaktních spor pro MALDI-TOF MS analýzu .....	53
3.5.2.2. Optimalizace přípravy vzorku pro MALDI-TOF MS.....	54
Matrice, její koncentrace, množství nanášené na destičku.....	54
Kombinace poměru matic .....	55
Vliv aditiv na zesílení signálů v proteinových proflech.....	56
3.5.2.3. Porovnání výsledků na různých přístrojích .....	57
3.5.2.4. Vliv koncentrace kyseliny trifluoroctové na buněčnou stěnu spor <i>B. lactucae</i> .....	60
Hmotnostní spektrometrie .....	60
Světelná mikroskopie.....	60
3.5.2.5. Volba MALDI destičky .....	61
3.5.2.6. Techniky nanášení vzorku s maticí na MALDI destičku .....	61
3.5.2.7. Vliv doby působení roztoku matrice na suspenzi spor.....	62
3.5.2.8. Použití celulas .....	62

3.5.3.	Získání spekter ostatních studovaných fytopatogenů .....	63
3.5.3.1.	Konstrukce databáze hmotnostních spekter pro biotyping .....	63
3.5.4.	Biotyping rostlinných patogenů přímo v biologickém materiálu .....	63
4.	Výsledky .....	65
4.1.	Optimalizace přípravy vzorku .....	65
4.1.1.	Množství vzorku a matrice, hustota suspenze, koncentrace TFA .....	65
4.1.2.	Výběr vhodné matrice .....	66
4.1.3.	Kombinace poměru matric .....	67
4.1.4.	Vliv aditiv na signál proteinových profilů .....	69
4.1.5.	Porovnání výsledků na různých přístrojích .....	70
4.1.6.	Vliv koncentrace kyseliny trifluoroctové na buněčnou stěnu spor <i>B. lactucae</i> .....	75
4.1.7.	Volba MALDI destičky .....	78
4.1.8.	Techniky nanášení vzorku s matricí na MALDI destičku .....	81
4.1.9.	Vliv doby působení roztoku matrice na suspenzi spor .....	83
4.1.10.	Použití celulas .....	84
4.1.11.	Konstrukce databáze hmotnostních spekter pro biotyping .....	86
4.1.12.	Biotyping rostlinných patogenů přímo v biologickém materiálu .....	89
5.	Diskuze .....	91
6.	Závěr .....	96
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....		97
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....		107

## **Cíle práce**

1. Optimalizace metody přípravy vzorku pro identifikaci intaktních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.
2. Konstrukce databáze hmotnostních spekter představující archiv peptidových a proteinových profilů studovaných patogenů.
3. Vývoj rutinní metody k identifikaci a biotypingu rostlinných patogenů přímo z listu.

# *Teoretická část*



## 1. Původci chorob rostlin

Organismy, které vyvolávají onemocnění u rostlin, bývají označovány jako fytopatogeny. Narušením metabolismu hostitele jejich vlivem dochází k rozvoji choroby se specifickými mikroskopickými a makroskopickými příznaky (symptomy). K původcům takovýchto infekčních chorob (bionóz) se řadí nebuněčné organismy – viry a viroidy; prokaryotické organismy – fytoplazmy a bakterie; eukaryotické organismy – peronospor, houby, prvoci, háďátka, roztoči, hmyz a rostliny (Kůdela, 1989; Sedlářová & Vinter, 2007).

Mykózy neboli onemocnění způsobené houbami a houbám podobnými organismy představují největší podíl hospodářsky významných chorob rostlin (Kůdela *et al.*, 1989).

### 1.1. Houbové organismy

Polyfyletická skupina „houbových organismů“ zahrnuje zástupce ze tří říší – Protozoa, Chromista a Fungi, dříve souhrnně označované jako houby. Jedná se o primárně heterotrofní stélkaté organismy. Jeden ze široce přijímaných systémů eukaryot (třídění do pěti říší: Protozoa, Chromista, Fungi, Animalia, Plantae) je založen na základě studií rDNA (Cavalier-Smith, 1998). Alternativní členění Eukaryot pak navrhli Simpson a Roger – Excavata, Amoebozoa, Rhizaria, Chromalveolata, Plantae, Pishokonta (Simpson & Roger, 2004).

Stélka (nebo tělo) hub může být jednobuněčná nebo vláknitá (myceliální), buď coenocytická (bez přepážek) nebo přehrádkovaná (různě utvářené přepážky oddělují buňky ve vlákně). Tyto heterotrofní organismy se podle způsobu získávání organických látek dělí na saprofyty, symbionty a parazity (biotrofní, hemibiotrofní nebo nekrotrofní). Životní cyklus se skládá ze dvou fází, které se mohou vyskytovat i současně, teleomorfa a anamorfa. Anamorfa je fáze, ve které se vytváří nepohlavní rozmnožovací struktury, a teleomorfa, fáze, ve které se tvoří pohlavní rozmnožovací struktury. Rozmnožování hub probíhá zejména pomocí různých typů spor. Nepohlavní spory (mitospory) vznikají buď endogenně ve sporangiu = sporangiospory, nebo exogenně na konidioforech = konidie. Podle schopnosti pohybu lze rozlišit zoospory (bičíkaté) nebo aplanospory (bez bičíku). Pohlavní spory (meiospory – u jednotlivých taxonomických skupin označované jako oospory, zygospor, askospory, bazidiospory) vznikají splynutím pohlavních buněk (gamet), pohlavních orgánů (gametangií) nebo somatických buněk. V průběhu pohlavního rozmnožování dochází ke změně ploidie ( $n \rightarrow 2n \rightarrow n$ ) ve třech procesech – plazmogamie, karyogamie a meióza (Kalina & Váňa, 2005).

Zástupci jednotlivých říší se od sebe liší v řadě charakteristik (Tab. 1), především typem stélky, chemickým složením buněčné stěny a charakterem bičíků (Kalina & Váňa, 2005, Carlile *et al.*, 2001).

**Tab. 1** Charakteristiky houbových organismů(upraveno podle - materiálů ke Cvičení ze systému nižších rostlin; <http://botany.upol.cz/>)

Říše	Buněčná stěna (BS)	Typ stélky	Charakter bičíků
<b>Protozoa</b>	v trofické fázi bez BS	jednobuněčné organismy, část živ. cyklu sdružené v pseudoplazmodiích nebo plazmodiích	2 bičíky, nemají tuhá mastigonemata*
<b>Chromista</b>	hlavní složka celulóza a $\beta$ -glukany	jednobuněčné nebo vláknité organismy (coenocytické)	2 bičíky, většina má mastigonemata
<b>Fungi</b>	hlavní složka chitin a $\beta$ -glukany	jednobuněčné nebo vláknité organismy (coenocytické, přepážkované mycelium)	přítomny pouze u skupiny Chytridiomycota (nemají mastigonemata)

\* duté vlásky na bičíku

## 1.2. Houboví patogeni rostlin

Většina fytopatogenů je na svém hostiteli troficky závislá (získávají z něj živiny). Tyto parazity lze rozdělit podle způsobu života na biotrofní, hemibiotrofní a nekrotrofní organismy. Biotrofní parazité žijí a rozmnožují se pouze v kontaktu svých hostitelských rostlin (nemohou být tudíž kultivovány na živných médiích). Do této skupiny například patří právě plísňe, padlí, sněti, rzi. Nekrotrofní parazité získávají živiny z odumřelých pletiv tím, že usmrcují buňky hostitele (narušením buněčné stěny, protoplastu, metabolismu), žijí tudíž jako saprofyty. Hemibiotrofní organismy stojí mezi těmito dvěma skupinami. Proces infekce je nejdříve biotrofní, později, s postupem infekce, buňky pletiv odumírají a parazit přechází do nekrotrofní fáze. Nekrotrofní a hemibiotrofní organismy lze pěstovat na umělých půdách (Agrios, 2005).

U výše jmenovaných skupin lze vymezit fakultativní (příležitostné) a obligátní (závazné) formy. Lze tedy rozlišit fakultativní saprofyty, jež převážně parazitují na rostlinách, ale za nepříznivých podmínek mohou přežívat i na odumřelých částech rostlin, a fakultativní parazity žijící převážně na odumřelé organické hmotě, ale za určitých podmínek mohou napadat živé rostliny a parazitovat na nich (Kavanagh, 2005).

Mykózy obecně nacházíme na všech částech rostliny (někteří patogeni jsou specializovaní na určité orgány = organotrofie), projevují se různými příznaky, od lokálního poškození až po odumření celé rostliny (Kavanagh, 2005, Kúdela, 1989).

**Tab. 2** Symptomy a makroskopické projevy mykóz (upraveno podle Kavanagh, 2005; Kůdela, 1989)

Název symptomu	Makroskopický projev
skvrnitost	ohraničené léze na listech hostitele
vadnutí	kolonizace a ucpání cévního systému, inhibice transportu vody a živin
sněť	hnědnutí a deformace listů, větví, stonků a květních orgánů
hniloba	rozpad pletiv kořenů, stonků, plodů, hlíz, cibulek
vředy	ohraničené, často propadlé rány na dřevěných stoncích
odumírání	nekróza větviček a vzrostných vrcholů
abnormální růst	zbytnělé puchýřovité nebo bradavčité otoky listů, kořenů, hlíz, stonků, větviček, proliferace pletiv - hyperplazie + hypotrofie
padání semenáčků	rychlý úhyn mladých rostlin
ochablost	zpožděný vývoj, menší vzrůst
antraknóza	nekrotické skvrny listů, stonků, květů a plodů
strupovitost	ohraničené léze strupovitého vzhledu na plodech, listech, hlízách
rzi	mnoho malých, často rezavě zbarvených lézí na listech a stoncích
plísňe a padlí	chlorózy nebo nekrózy nadzemních orgánů + bílý povlak mycelia a rozmnožovacích orgánů

Mnoho nemocí se vyznačuje kombinací výše jmenovaných příznaků (Kavanagh, 2005). Mezi obligátními biotrofními patogeny zemědělsky důležitých plodin jsou velice významné peronospory („downy mildews“) a padlí („powdery mildews“, Kalina & Váňa, 2005).

**Tab. 3** Srovnání charakteristik peronospor a padlí (Agrios, 2005; Kalina & Váňa, 2005)

	Peronospory	Padlí
Taxonomické zařazení:	říše oddělení řád Chromista Oomycota Peronosporales	Fungi Ascomycota Erysiphales
Stélka	vláknité, větvené, nepřehrádkované (coenocytické), intercelulární mycelium	vláknité, větvené, přehrádkované, extramatrikální mycelium
Buněčná stěna	celulóza, $\beta$ -1,3- a $\beta$ -1,6-polyglukany	chitin a $\beta$ -1,3-polyglukany
Rozmnožování nepohlavní	diploidní zoospory uvolňující se ze zoosporangií, která se chovají někdy jako jednosporová sporangia, konidie	haploidní konidie uvolňující se z koncové části konidioforu
Rozmnožování pohlavní	oogametangiogamie: diploidní oospora (tlustostěnná) - splynutím oogonia (♀) a anteridia (♂)	gametangiogamie: haploidní askospory - splynutím askogonia s anteridiem, uloženy ve vřecku v plodnici
Životní cyklus	převážně diploidní	haplo-dikaryotický s převažující haploidní fází
Nároky na podmínky Symptomy	dostatečně vlhké prostředí světležluté až žluté skvrny na svrchní straně listů, bílý, šedý nebo hnědý povlak konidioforů na spodní straně listu	suché a teplé prostředí žluté až světlehnědé skvrny na listech, moučné bílé povlaky na povrchu listu

### 1.3. Peronospory

Peronospory, zástupci řádu Peronosporales jsou součástí třídy Peronosporomycetes (syn. Oomycetes), která je jedinou třídou oddělení Peronosporomycota patřící do říše Chromista (syn. Straminipili nebo Stramenopila). Na základě podobných morfologických znaků (vláknitý růst mycelia, tvorba pohlavních a nepohlavních spor) byly dříve tyto organismy (někdy označované ve starší literatuře jako „houby vaječné“) považovány za součást říše Fungi. Podrobnějšími studii molekulových znaků bylo však prokázáno, že tyto dvě skupiny mají rozdílné předky. Porovnáním genů kódujících malou ribozomální jednotku bylo zjištěno, že zástupci říše Fungi mají společného předka s živočišnou říší, zatímco Oomycety mají předky společné s heterokontními řasami, a proto byly překlasifikovány do samostatné říše Chromista (Simpson & Roger, 2002; Bhaduria *et al.*, 2009).

#### 1.3.1. Fylogenetické vztahy v rámci třídy Peronosporomycetes

K vyřešení fylogenetických vztahů v rámci třídy Peronosporomycetes přispělo mnoho studií sekvencí ribozomální DNA (rDNA) různých autorů (Riethmüller *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Cooke *et al.*, 2000; Petersen & Rosendahl; 2000). K potvrzení hypotéz byla využita také data ze sekvencí mitochondriálního lokusu COX2 (cytochrom c oxidasa 2) kódující podjednotku 2 cytochrom c oxidasy (COII), jež byla kompatibilní s rDNA studii (Hudspeth *et al.*, 2000).

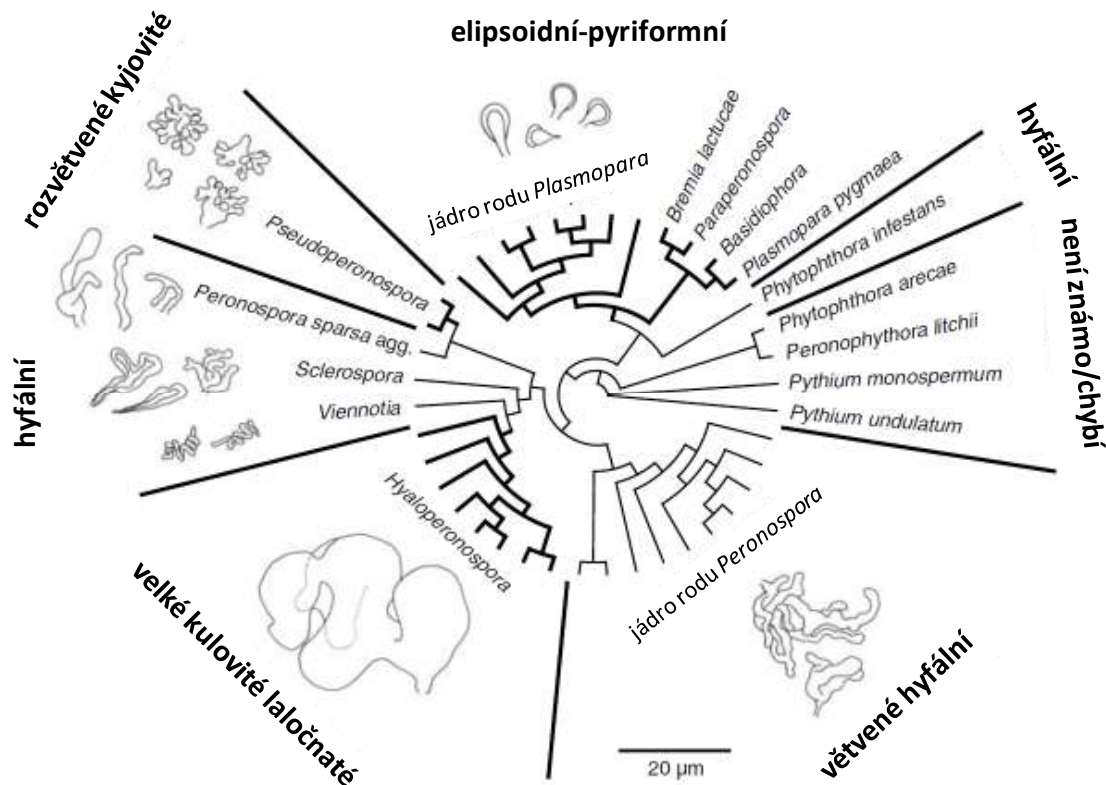
Velká ribozomální podjednotka (28S rDNA), jakožto užitečný prostředek při studiu fylogenetických analýz, byla využita k testování fylogenetických předpokladů v rámci čeledi Saprolegniaceae a fylogenetických vztahů hlavní linie třídy Peronosporomycet (Riethmüller *et al.*, 1999, Petersen & Rosendahl; 2000). Zvláštní důraz byl kladen na zkonstruování hypotézy o fylogenetických vztazích týkajících se podtřídy Saprolegniomycetidae. Bylo však potřebné provést další analýzy týkající se detailní studie podtřídy Peronosporomycetidae, jež jsou stále nedostačující.

V novém členění tř. Peronosporomycetes navrženém Dickem (1995) jsou tři podtřídy, Saprolegniomycetidae, Rhipidiomycetidae a Peronosporomycetidae. Tato klasifikace byla založena na morfologických a ultrastrukturálních vlastnostech (oosporogeneze, buněčná stěna oospor, protoplasmatická struktura oospor) a z velké části byla potvrzena i následnými studii sekvencí dat. (Riethmüller *et al.*, 1999, Hudspeth *et al.*, 2000, Petersen and Rosendahl 2000). Přesto jsou fylogenetické vztahy v rámci těchto skupin stále málo jasné, zvláště pak u vývojově pokročilejší podtřídy Peronosporomycetidae, skupiny zahrnující významné fytopatogeny, které jsou pro svou výjimečnou patogenitu a epidemické šíření v kulturních porostech podrobně studovány.

Vývojové trendy silně ovlivnily fylogenetické hypotézy celé skupiny. Po dlouhá léta byla přijímána myšlenka, že evolučně odvozenější Peronosporales mají původ v evolučně primitivnější skupině *Pythium-Phytophthora*.

V posledních aktuálních klasifikacích zahrnuje podtř. Peronosporomycetidae dva řády: 1) ř. Pythiales jako primitivnější linii s rody *Pythium* a *Phytophthora*, tj. fakultativní parazity rostlin; 2) ř. Peronosporales, obligátní parazity, řazené do dvou čeledí: Albuginaceae a Peronosporaceae. Peronosporaceae je se svými s osmi rody (*Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Bremiella*, *Paraperonospora*, *Peronospora*, *Plasmopara* a *Pseudoperonospora*) a zhruba 600 druhů největší čeledí ze tř. Peronosporomycetes (Riethmüller *et al.*, 2002).

Práce Riethmüllera (2002) byla tudíž dále zaměřena na objasnění fylogenetických vztahů v rámci podtř. Peronosporomycetidae analýzou nových sekvenčních dat. Tato práce potvrdila nedostatky současné klasifikace podtř. Peronosporomycetidae, jakožto polyfyletické skupiny a navrhla reklasifikaci některých skupin. Hlavní rozdělení do ř. Pythiales a Peronosporales, na jedné straně, a Saprolegniales, Leptomitales a Rhipidiales, na straně druhé, zůstává zachováno. Fylogenetické vztahy uvnitř těchto skupin jsou stále nedostatečně prozkoumány a jejich systém je v rekonstrukci (Riethmüller *et al.*, 2002).



**Obr. 1** Zjednodušený fylogenetický strom podle Goker *et al.* (2003) s uvedením různých typů haustorií u jednotlivých rodů peronospor. Několik taxonů rodu *Peronospora* bylo z původního schématu vynecháno pro lepší grafické znázornění. Zvýrazněné větve znázorňují předpokládané apomorfní (= odvozené) typy haustorií. Hyfální haustoria jsou považována za pleziomorfní znak, protože jsou přítomny i u některých druhů rodu *Phytophthora*. Haustoria u rodu *Pseudoperonospora*, i když jsou v podstatě hyfální (Fraymouth 1956), jsou odlišena díky charakteristickému rozvětveně kyjovitému ('prstovitému') tvaru. Všechny kresby haustorií jsou ve stejném měřítku od typových druhů rodu, kromě r. *Plasmopara* (z *Pl. umbelliferarum*); haustoria r. *Viennotia* překreslena z Göker *et al.* (2003), všechny ostatní originální kresby.

### 1.3.2. Životní a infekční cyklus peronospor

Zástupci polyfyletického řádu Peronosporales parazitují na suchozemských dvouděložných, zřídka i jednoděložných, rostlinách, včetně léčivých rostlin, které produkují velké množství alkaloidů nebo esenciálních olejů. Peronospory napadají převážně nadzemní části rostlin, limitujícím faktorem pro šíření patogena v porostu a vznik epidemie je dostatečná vlhkost (Dick, 2001; Kalina & Váňa, 2005).

Stélka peronospor je z části tvořena vegetativními orgány (mycelium) a z části rozmnožovacími orgány, (konidio)sporangiofory a (konidio)sporangia. Mycelium bývá coenocytické (nepřehrádkované), větvené, intercelulární (roste v pletivu mezi buňkami). Parazitické druhy na myceliu vytvářejí haustoria, jež pronikají buněčnou stěnou, vychlipují plazmatickou membránu, a takto získávají živiny z okolních buněk pletiv hostitele. Podle tvaru

haustorií lze podobně jako podle tvaru (konidio)sporangioforů a (konidio)sporangii charakterizovat jednotlivé druhy patogenů (Dick, 2001; Kalina & Váňa, 2005).

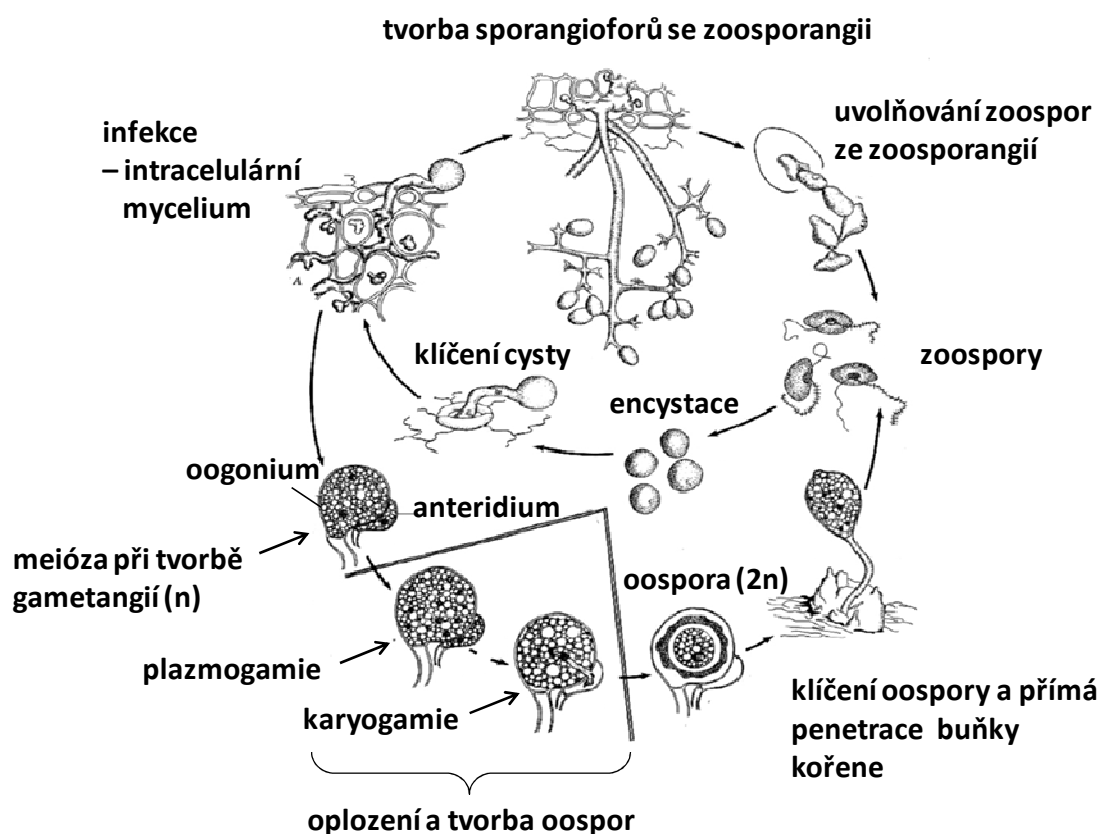
Rozmnožují se nepohlavně zoosporami nebo konidiosporami (Obr. 2), pohlavně pomocí gametangií (odlišné velikostí i tvarově, samičí oogonium, samčí anteridium; pohlavní proces = oogamie). Zoospory se uvolňují ze zoosporangií, vyrůstajících na sporangioforech (speciální hyfy stroměčkovitého vzhledu). U některých druhů (případně za určitých podmínek) se zoosporangia chovají jako jednosporová sporangia (konidie) a přímo klíčí v hyfu. Tento evoluční znak je spojován s adaptací organismů při přechodu z vody na souš. Přechod od saprofytismu k obligátnímu parazitismu a specializace na určitý orgán hostitele (organotropie) jsou také důsledkem adaptace (Kalina & Váňa, 2005).



**Obr. 2** Konidiosporangiofory s konidiosporangii, oogonium a anteridium *Bremia lactucae* (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Bremia%20lactucae>).

Životní cyklus (Obr. 3) probíhá tak, že za příznivých podmínek vyklíčí z diploidní oospory zoosporangium, v němž se tvoří zoospory ( $2n$ ), jež klíčí v hyfách na listech hostitele a prorůstají intercelulárně do pletiv listů a pomocí haustorií pronikají do buněk. Sporangiofory nesoucí zoosporangia vyrůstají na spodní straně listu skrz průduchy. Klíčením zoosporangií vznikají zoospory, které dále infikují další rostliny. Pohlavní rozmnožování probíhá v pletivu hostitele ke konci vegetačního období, kdy se splynutím gametangií tvoří oosféra a následně tlustostěnné oospory přezimující v odumřelých a opadaných částech rostlin.

Podle způsobu pohlavního rozmnožování se rozlišují druhy homothalické a heterothalické. U homothalických druhů (např. *Plasmopara halstedii*) splývají jádra obou typů gametangií, která vyrůstají na jedné stélce vzniklé z jedné spory. Heterothalické druhy (např. *Bremia lactucae*) mají dvě skupiny fyziologicky odlišných stélek (+ a -) a splývají pouze gametangia opačných pohlaví pocházející z různých párovacích typů stélky (Kalina & Váňa, 2005).



**Obr. 3** Životní cyklus vřetenatky révové, *Plasmopara viticola* (řád Peronosporales) (Kalina & Váňa, 2005, upraveno podle Alexopoulou, 1966).

### 1.3.3. Zástupci řádu Peronosporales

Jednotlivé rody bývají identifikovány na základě morfologických znaků, například podle způsobu větvení a tvaru sporangioforů, charakteru konidiosporangii a tvaru haustorií (Kalina & Váňa, 2005). Mezi hospodářsky významné fytopatogeny patří například rod *Peronospora*, jež je nejpočetnějším rodem tohoto řádu. Konidiosporangiofory jsou větvené, na konci zašpičatělé, zoospory se nikdy ve sporangii nevytvářejí (Kalina & Váňa, 2005). Vřetenatka cibulová (*Peronospora destructor*, Obr. 4) napadá například cibuli a šalotku, zatímco *Peronospora farinosa* způsobuje onemocnění cukrové řepy, červené řepy, špenátu, ale často parazituje i na plevelcích jako je *Atriplex* nebo *Chenopodium*. V posledních studiích však bylo, na základě morfologických a molekulárních analýz, prokázáno, že existuje nejméně 5 odlišných druhů peronospor parazitujících na rostlině rodu *Chenopodium* (Choi *et al.*, 2008). Takzvanou „modrou“ plíseň může způsobit Vřetenatka tabákové (*Peronospora tabacina*) s modrofialovými sporangii na listech tabáku. Tento druh byl do Evropy zavlečen z Ameriky a Austrálie v roce 1958 (Smith *et al.*, 1988; Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007). Brukvovité rostliny (tuřín, květák, růžičková kapusta, čekanka) napadá *Peronospora parasitica*.



Kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris*) bývá často hostitelem tohoto druhu (Webster & Weber, 2007).

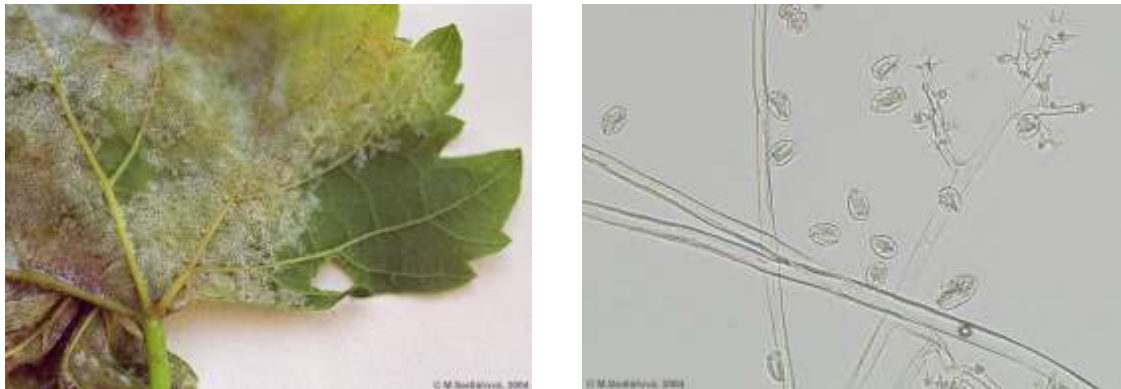


**Obr. 4** *Peronospora destructor*, plíseň cibulová. Příznaky napadení plísní na nati cibule (vlevo), sporangiofor s oválným zašpičatělým sporangiem typickým pro *P. destructor* (vpravo). (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Peronospora%20destructor>).

Rod *Plasmopara* (vřetenatka) se vyznačuje sporangiofory větvenými laterálně, na konci jsou tupé. Vřetenatka slunečnicová (*Plasmopara halstedii*), parazit hvězdnicovitých rostlin (Obr. 5), pochází ze Severní Ameriky, ale v současné době je rozšířen celosvětově a způsobuje rozsáhlé škody při pěstování slunečnice. Od roku 2002 je i v České republice zařazován mezi karanténní choroby (Sedlářová *et al.*, 2010). Plíseň révová (*Plasmopara viticola*) způsobuje onemocnění vinné révy (Obr. 6). Do Evropy byla zavlečena ze Severní Ameriky v letech 1870-1878 s katastrofálními následky na francouzské vinice, které nebyly předtím vystaveny patogenům, a tudíž pěstované odrůdy byly na vřetenatku velice náchylné. Nutnost ochrany vinic dopomohla objevit jeden z prvních fungicidů na světě, “Bordeaux mixture“ tj. roztok síranu měďnatého,  $\text{CuSO}_4$  a vápna,  $\text{Ca(OH)}_2$ , který je dosud velice účinný proti *P. viticola* a dalším peronosporám (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007). Vřetenatka mrkvová (*Plasmopara nivea*) je parazitem miříkovitých, jako je mrkev nebo petržel. Často bývá nacházena na bršlici kozí noze (*Aegopodium podagraria*). Vřetenatka rybízová (*Plasmopara ribicola*) je zodpovědná za brzký opad listů a nedokonalé zrání plodů rybízu a angreštu (Kalina & Váňa, 2005). *Plasmopara pygmaea* parazituje na sasance hajní (*Anemone nemorosa*), zatímco *Plasmopara pusilla* je spojována s kakostem lučním (*Geranium pratense*) jako hostitelskou rostlinou (Webster & Weber, 2007).



**Obr. 5** *Plasmopara halstedii*, vřetenatka slunečnicová. Sporulace podél listových žilek na spodní straně listů (vlevo), souvislý povlak intenzivně sporulujícího mycelia vyskytující se za dostatečné vzdušné vlhkosti i na svrchní straně listu (uprostřed), sporangiofory a zoosporangia (vpravo) (Sedlářová *et al.*, 2010).



**Obr. 6** *Plasmopara viticola*, vřetenatka réвовá. Sporulace vřetenatky na listech vinné révy (vlevo), konidiosporangiofor (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Plasmopara%20viticola>).

Rod *Pseudoperonospora* je přechodný typ mezi rody *Peronospora* a *Plasmopara*. Vřetenatka okurková (*Pseudoperonospora cubensis*) často napadá okurku (Obr. 7) a příbuzné tykvovité rostliny (*Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita* spp., *Citrullus vulgaris*). *P. cubensis* parazitující na výše jmenovaných rostlinách je považován za jeden taxonomický druh, jehož morfologické znaky a infekčnost závisí na hostiteli a okolních podmínkách (Iwata 1942, Waterhouse & Brothers, 1981). Doposud nebylo na základě molekulárních či genetických znaků potvrzeno, zda se jedná o jeden izolát parazitující na více hostitelských druzích (Choi *et al.*, 2005) Podle schopnosti napadat různé hostitelské druhy jsou rasy v rámci tohoto druhu řazeny do několika podtypů (Lebeda *et al.*, 2010). Vřetenatka chmelová (*Pseudoperonospora humuli*) je druh parazitující na chmelu, pocházející původně z Dálného Východu (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007). Studie srovnávající morfologické znaky obou druhů parazitů (*P. cubensis* a *P. humuli*) naznačily blízký vztah mezi těmito dvěma

peronosporami (Shin & Choi, 2003). Na základě studií podobných morfologických a molekulárních znaků těchto dvou pseudoperonospor zahrnuli Choi *et al.* (2005) *P. humuli* jako taxonomické synonymum *P. cubensis*. Zůstává však faktem, že izoláty z chmele nejsou schopny napadat tykvvité rostliny a *vice versa* (Lebeda, ústní sdělení).



**Obr. 7** *Pseudoperonospora cubensis*, plíseň okurková. Skvrny na vrchní straně listu okurky (*Cucumis sativus*, vlevo), sporující mycelium na spodní straně (uprostřed) a konidiosporangiofory s konidiosporangii na listu (vpravo)

(<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Pseudoperonospora%20cubensis>).

Rod *Bremia* má sporangiofory zakončené útvary terčovitěho vzhledu, na nichž vyrůstají sporangia, haustoria jsou vakovitěho tvaru (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007). Nejvýznamnější patogen je plíseň salátová (*Bremia lactucae*, Obr. 8), celosvětově rozšířený patogen lociky seté (*Lactuca sativa*), která ničí převážně semenáčky nebo mladé rostlinky pěstovaného salátu, ale napadá mnoho dalších rostlin z čeledi Asteraceae (Lebeda *et al.*, 2002; Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007). Nejznámější divoce rostoucí hostitelská rostlina je locika kompasová (*Lactuca serriola*), či druhy rodu mléč, *Sonchus* (Lebeda *et al.*, 2002; Lebeda & Petrželová, 2004a; Lebeda & Syrovátko, 1988; Petrželová & Lebeda, 2004b). *Bremia lactucae* byla dlouhá léta využívána jako modelový příklad ke studiím vztahů mezi hostitelem a biotrofními parazity (Lebeda *et al.*, 2008a, b).



**Obr. 8** *Bremia lactucae*, plíseň salátová. Příznaky a sporulace na *L. serriola* (vlevo), příznaky na listech lopuchu (uprostřed), konidiosporangiofor a konidiosporangii (vpravo)

(<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Bremia%20lactucae>).



Rod *Albugo* je jediný rod z čeledi Albuginaceae, který parazituje na rostlinách čeledí laskavcovité (*Amaranthaceae*), hvězdnicovité (*Asteraceae*) a brukvovité (*Brassicaceae*). Jejich haustoria jsou drobná, kulovitá. Sporangiofory jsou cylindrického nebo kuželovitého tvaru, nesoucí řetízky kulovitých sporangií. Důležitou odlišností od čel. Peronosporaceae je, že sporangiofory vznikají subepidermálně a vytvářejí rozsáhlá ložiska spor, která jsou uvolněna až po prasknutí pokožky. Plíseň bělostná (*Albugo candida*, Obr. 9) může parazitovat na kapustě, zelí, ředkvičce, ale také na kokošce pastuší tobolce. *Albugo occidentalis* (Obr. 10) je možno vidět na špenátu (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007).



**Obr. 9** *Albugo candida*, plíseň bělostná. Ložiska sporangií na listech *Lunaria annua* (vlevo), ložiska sporangií na šešuli *L. annua* (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Albugo%20candida>).



**Obr. 10** *Albugo occidentalis*. Ložiska sporangií na listu *Amaranthus retroflexus* (vlevo i vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Albugo%20occidentalis>).

## 1. 4. Padlí

Zástupci řádu Erysiphales jsou řazeny mezi vřeckovýtrusné houby, tj. do třídy oddělení Ascomycotina, což je nejpočetnější všeobecně rozšířená skupina říše Fungi.

Jedná se o monofyletický řád zahrnující okolo 500 druhů, z nichž všechny jsou obligátní biotrofní parazité rostlin. Všichni jsou zástupci jedné čeledi Erysiphaceae a vytvářejí na povrchu listů hostitelských rostlin bílý moučný povlak („powdery mildews“). Napadají pouze krytosemenné, zejména dvouděložné rostliny z čeledí hvězdicovité (Asteraceae), břízovité (Betulaceae), bobovité (Fabaceae), bukovité (Fagaceae), rdesnovité (Polygonaceae), růžovité (Rosaceae), vrbovité (Salicaceae). Existují však výjimky - padlí travní (*Blumeria graminis* syn. *Erysiphe graminis*) napadající jednoděložné rostliny, obilniny a trávy (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007).

### 1.4.1. Fylogenetické aspekty v rámci ř. Erysiphales

Řád Erysiphales je jasně vyčleněn a definován jako skupina. Ale dosavadní otázkou zůstává, přesné postavení v oddělení Ascomycota. Fylogenetická pozice je spíše izolovaná, někdy bývá spojována s řádem Helotiales (Saenz & Taylor, 1999b).

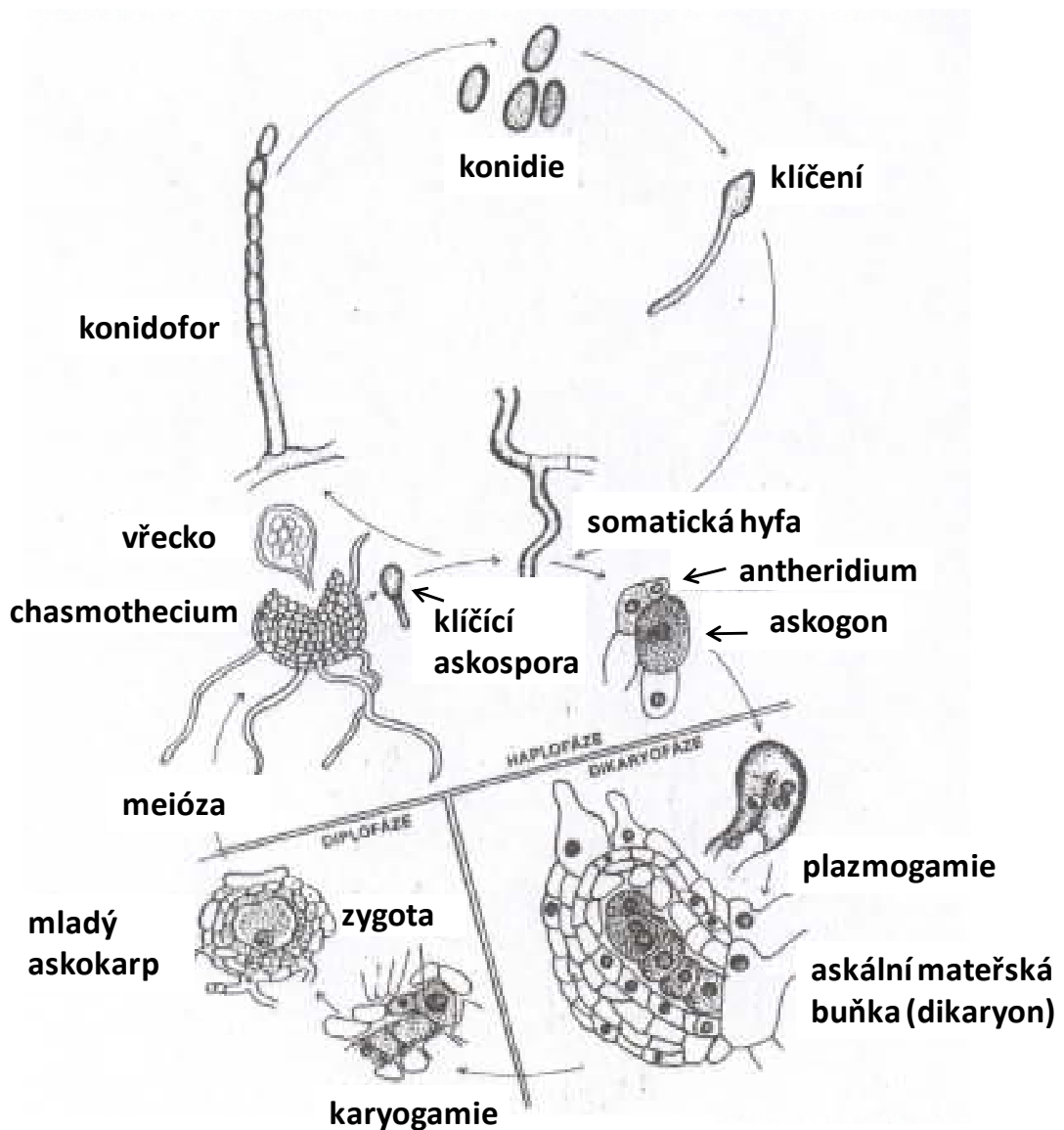
Mnoho let byla taxonomie rodů a druhů založena na systému navrženém Léveilléem (1851), který zdůrazňoval vlastnosti a vzhled chasmothecií (syn. kleistothecií), zvláště počet a tvar přívěsků (apendixů), jež mohou být jednoduché, zahnuté, větvené nebo baňkovitého tvaru. Hodně dalších prací se zabývalo problematikou, jak nejlépe a podle jakých struktur identifikovat padlí (To-anum *et al.*, 2005). Po analýzách a pozorování povrchů konidií pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), jež přinesly nové skutečnosti o jejich vzhledu (Cook *et al.*, 1997), a studiích nukleotidových sekvencí rDNA ITS, „internal transcribed spacer“ (Takamatsu *et al.* 1998, 1999, 2000; Saenz & Taylor 1999a; Mori *et al.*, 2000) uvedl Braun *et al.* (2002), že základ pro druhovou taxonomii je morfologie anamorfy, jež odráží fylogenezi v této skupině hub. Teleomorfa je tedy méně důležitá, ale poskytuje užitečné informace o druzích. Vlastnosti patogenů ve stádiu anamorfy dobře souhlasí s charakterem povrchu konidií studovaných elektronovou mikroskopií (Cook *et al.*, 1997). Rody řádu Erysiphales jsou v současné době definovány hlavně podle anamorf, neboť vzhled chasmothecií a přívěsků bývá podobný nebo stejný u více než jednoho taxonu (Saenz & Taylor, 1999a).

### 1.4.2. Životní a infekční cyklus padlí

Mycelium je přehrádkované a vytváří se pouze na povrchu pletiv hostitele (extramatrikální). Do hostitele pronikají pomocí haustorií narušením epidermálních buněk. Nepohlavní rozmnožování je zprostředkováno tvorbou arthrokonidií (oidií), rozpadem

myceliálního vlákna (konec konidioforu). Klíčení oidii může, na rozdíl od ostatních houbových organismů, probíhat i při relativně nízké vlhkosti, není tedy vyžadován příjem vody z prostředí, neboť spory jsou plně hydratovány. Dokonce v některých případech je klíčení vodou inhibováno. Pohlavní rozmnožování je zprostředkováno gametangiogamií (askogon, ♀, oplodněn anteridiem, ♂) vznikají plodnice (chasmothecia s apendixy, někdy nazývána „erysiphální peritecia“ nebo kleistothecia). Plodnice jsou uzavřené, otvírají se rozpadem a v závislosti na druhu obsahují plodnice různý počet věceček (asci) o různém počtu askospor. Rodově specifický je rovněž charakter přívěsků na chasmotheciích. Za vhodných vegetačních podmínek plodnice praskají pod tlakem zralých věceček, věcečka rovněž praskají ve ztenčeném místě (Obr. 11) a uvolňují se z nich haploidní askospory, klíčí v hyfy tvořící mycelium, do kterého přechází jaderné informace ze spor. (Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007).

Haploidní monokaryotické mycelium dává vzniknout krátkým konidioforům, které nesou řetězec konidií vznikající fragmentací mycelia a jsou roznášeny proudem vzduchu. Ke konci vegetační sezóny se začnou tvořit pohlavní orgány. Morfologicky odlišné jednojaderné askogonium (♀) a mnohojaderné antheridium (♂) se diferencují z myceliálních hyf. Přijdou-li spolu do kontaktu, přechází jaderný obsah z antheridia do askogonia (bez přítomnosti trichogynu - fertilizační trubice, kterou přechází jádro z antheridia do askogonia u jiných věckovýtrusných hub), následuje fúze cytoplasmy (olasmogamie), askogonium začíná tvořit askogenní (dikaryotické) hyfy, které se současně se začínají dělit, proplétat a tvořit stěnu askokarpu. Jaderná fúze (karyogamie) se odehrává v mladých věckách, které se začínají prodlužovat a dochází k meióze, kdy vzniká 1-8 jader, které jsou začleněny do vznikajících askospor (Agrios, 2005; Mueller *et al.*, 2004).



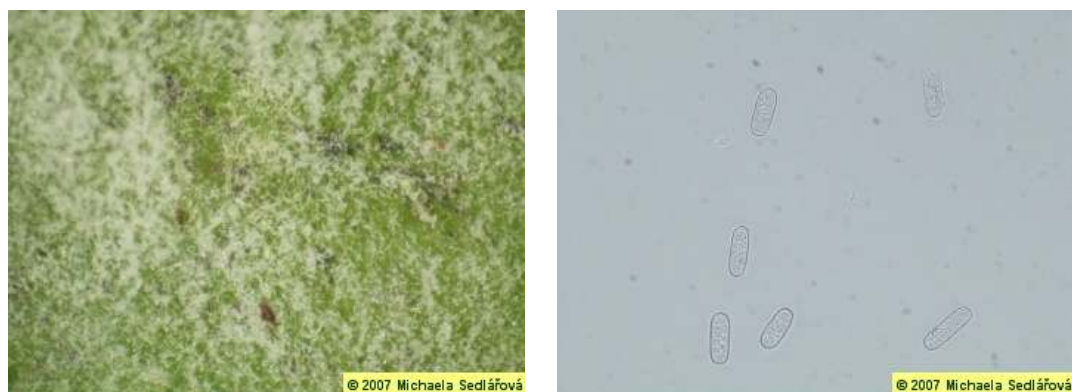
**Obr. 11** Životní cyklus padlí jabloňového, *Podosphaera leucotricha* (řád Erysiphales) (upraveno podle Urbana & Kaliny, 1980).

#### 1.4.3. Zástupci ř. Erysiphales

Čeď Erysiphaceae je dělena do několika rodů, *Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Sawadaea*, *Microsphaera*, *Oidium*, *Podosphaera*, *Phyllactinia*, *Uncinula*, *Golovinomyces*, *Blumeria*.

Rod *Erysiphe* je charakterizován nediferenciovanými myceliálními přívěsky, knoflíkovými haustorii a cylindrickými konidii. Anamorfa dává vzniknout vždy jen jedné konidii, to znamená, že se neřetězí a je typem *Pseudoidium*. Proto se druhy *Erysiphe* dělí do větví ještě podle morfologie přívěsků chasmothecií (Saenz & Taylor, 1999a; Mori *et al.*, 2000). Braun *et al.* (2002) tedy navrhl zahrnutí rodů *Microsphaera* a *Uncinula* do rodu *Erysiphe*. Mezi hospodářsky nejvýznamnější patří například *Erysiphe cruciferarum*, padlí brukvovitých. Způsobuje vážné infekce na zelí a růžičkové kapustě. Morfologicky je podobný

padlí rdesnovému (*Erysiphe betae*), padlí parazitujícím na cukrové řepě. Padlí hrachové (*Erysiphe pisi*, Obr. 12) je kosmopolitně rozšířený patogen luštěnin, jako je hrách nebo vojtěška (Gil & Gay, 1977), ale také i hrachoru (rod *Lathyrus*). Vyznačuje se bílošedými koloniemi na listech, stoncích a luscích (Dixon 1978; Poulter *et al.*, 2003). *Erysiphe trifolii* napadá hlavně jetel. Padlí bolševníkové (*Erysiphe heraclei* syn. *E. umberliferarum*) parazituje na miříkovitých jako je mrkev, celer, bolševník (Saenz & Taylor, 1999a; Mori *et al.*, 2000).



**Obr. 12** *Erysiphe pisi*, padlí hrachové. Mycelium na listu (vlevo), konidie (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Erysiphe%20pisi>).

Zástupci rodu *Microsphaera* a *Uncinula* spadají z části podle morfologie anamorfy do rodu *Erysiphe* a odlišují se pouze podle charakteru přívěsků na chasmotheciích.

Rod *Microsphaera* se vyznačuje několika věcký v chasmotheciu, s přívěsky na koncích se specificky rozdvoujícími. Padlí dubové (*Microsphaera* /*Erysiphe*/ *alphitoides*) způsobuje plíseň na dubu (*Quercus robur*). Objevuje se od června, napadá převážně mladé listy a semenáčky a narušuje tak normální růst. Někdy není vůbec přítomna fáze teleomorfy, běžná bývá za horkých klimatických podmínek (Webster & Weber, 2007). *Microsphaera grossulariae* je padlí angreštové, *Erysiphe vanbrutiana*, padlí bezové.

Zástupci rodu *Uncinula* rovněž tvoří několik věcek v každém chasmotheciu, přívěsky se však liší, jsou na koncích zahnuté. Nejznámější patogen je *Uncinula necator*, padlí révové (Obr. 13), které bylo do Evropy zavlečeno v roce 1845 ze Severní Ameriky a podobně jako *P. viticola* způsobilo velké škody na vinicích ve Francii (Smith *et al.*, 1988).





**Obr. 13** *Uncinula necator*, padlí révové. Vlevo - kleistothecia, vpravo - konidie-nepohlavní rozmnožování (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Uncinula%20necator>).

Zástupcem rodu *Oidium* je například u nás rostoucí padlí rajčatové, *Oidium neolycopersici*, jež bylo dlouhou dobu nazýváno různými termíny, *Oidium lycopersicum*, *Erysiphe orontii* nebo *Erysiphe cichoracearum*, z důvodu nepřesných informací o struktuře a morfologii patogena (Bélanger & Jarvis, 1994; Boiteux, 1994; Koike & Saenz, 1999). Poté došlo k přejmenování (podle International Code of Botanical Literature) na *Oidium lycopersici* (Mieslerová & Lebeda, 1999), ale až po analýze jaderné ribozomální RNA (rRNA) bylo možno od sebe odlišit *Oidium neolycopersici* (Jones *et al.*, 2000). Kiss *et al.* (2001) nakonec potvrdil skutečnost, že padlí studované na rajčatech vyskytující se v Austrálii (*Oidium lycopersici*) se liší konidiiemi, jež vždy tvoří řetízky od *Oidium neolycopersici* (Obr. 14) tvořící konidie jednotlivě nebo při vlhkých podmínkách v pseudořetízcích (2-6 konidií).



**Obr. 14** *Oidium neolycopersici*, padlí rajčatové. Mycelium na listech rajčete (vlevo), *Oidium neolycopersici*-mycelium a konidiofory (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Oidium%20neolycopersici>).

Rod *Golovinomyces* byl dříve řazen do rodu *Erysiphe*, ale liší se morfologií anamorfy. U *Golovinomyces* se na konidioforu tvoří řetězící se konidie s mírně zdrsňeným povrchem (Cook *et al.*, 1997). Podle Brauna (1987) jsou patogeny napadající čeled' hvězdicovitých nazývány *Golovinomyces cichoracearum* (Obr. 15) a většinu ostatních nazývá *G. orontii*.

Parazitují na rostlinách z čeledi *Solanaceae* a *Cucurbitaceae* (meloun, okurka, dýně, tykev), ale není jasné, zda stejný druh parazituje na obou čeledích. Například na tykvích bylo popsáno *G. cucurbitacearum*, běžně se však používá označení *Golovinomyces cichoracearum* (Sedláková & Lebeda, 2010).



**Obr. 15** *Golovinomyces cichoracearum*, padlí tykvovitých. Konidie - nepohlavní rozmnožování (vlevo), konidiofor s konidiiemi - nepohlavní rozmnožování (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Golovinomyces%20cichoracearum>).

Rody dříve označované jako *Podosphaera* a *Sphaerotheca* se jednoduše odlišují od ostatních rodů morfologií chasmotheciálních přívěsků a v současné době jsou sdruženy do jedné skupiny, kdy název rodu *Podosphaera* dostal přednost před *Sphaerotheca* (Braun *et al.*, 2002). Chasmothecia obsahují jenom jedno vřecko, konidie se řetězí a obsahují nápadná fibrosinová tělíska (filamentární orgány, které lomí světlo při mikroskopickém pozorování). Biochemické složení a funkce není známa. *Podosphaera macularis*, je padlí chmele, či jahodníku, *Podosphaera mors-uvae* americké padlí angreštu, *Podosphaera pannosa*, padlí růžovitých. *Podosphaera leucotricha* parazituje na jabloních. *Podosphaera xanthii* (Obr. 16) je významným patogenem tykvovitých rostlin (meloun, tykev, dýně, okurka) především v teplých oblastech (Jahn *et al.*, 2002).



**Obr. 16** *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), padlí tykvovitých. Sporulující mycelium na listu tykve *Cucurbita* sp. (vlevo), konidiofor s konidiiemi (uprostřed), konidie (vpravo) (<http://botany.upol.cz/atlas/system/gallery.php?entry=Podosphaera%20xanthii>).

Padlí javorové (*Sawadaea bicornis*) spadá do rodu *Sawadaea*, dříve řazeného do rodu *Uncinula*. Tvoří chasmothecia se spirálovitě stočenými konci apendixů. Od rodu *Uncinula* se však liší svými mikro- a makrokonidiemi, které mají oktagonální tvar, řetězí se a obsahují fibrosinová tělíska (Braun, 1987).

Rod *Phyllactinia* má anamorfu lišící se od ostatních padlí. Tvoří totiž jak vnější (ektofytické), tak vnitřní (endofytické) mycelium. Povrchové mycelium dává vzniknout velkým konidiím různého tvaru. Padlí lískové (*Phyllactinia guttata* syn. *P. corylea*) roste na lísce obecné a dalších dřevinách. Tvoří chasmothecia na spodní straně listů, konidie jsou kyjovitého tvaru, jsou tvořeny jednotlivě a klasifikovány jako typ *Ovulariopsis*. *Phyllactinia fraxini* (Obr. 17) je padlí jasanové. Chasmothecia jsou nápadná apendixy s bazální zduřeninou (Weber & Webster, 2001).



**Obr. 17** *Phyllactinia fraxini* (padlí jasanové). Kleistothecia, vlevo; konidie, uprostřed; věcko se třemi askosporami, vpravo (Erper *et al.*, 2010).

Jak již bylo uvedeno, padlí travní (*Blumeria graminis* syn. *Erysiphe graminis*) parazituje na jednoděložných travinách a zemědělsky významných obilninách jako je pšenice, oves. Od ostatních rodů se liší vzhledem prstovitých haustorií, kdežto od ostatních zástupci Erysiphales, mají haustoria knoflíkového tvaru. Druhým rozdílem jsou zduřelé konidie, u kterých bylo zjištěno pomocí elektronové mikroskopie, že mají ostnitou stěnu a septum, jež je vystouplé a obklopené stlačeným mezikružím (Cook *et al.*, 1997). Rod *Blumeria* (Obr. 18) zahrnuje pouze jeden druh, který je rozdělován do několika „*formae speciales*“ (f. sp.) odlišující jednotlivé hostitelské traviny (*Agropyron*, *Bromus*, *Poa*) nebo obilniny (ječmen, oves, pšenice, žito). To znamená, že *B. graminis* f. sp. *tritici* infikuje pšenici (*Triticum*), zatímco ječmen (*Hordeum*) může být napaden *B. graminis* f. sp. *hordei* (Hiura, 1978).



**Obr. 18** *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (vlevo) - konidie rostoucí na listech ječmene (*Hordeum*), *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (vpravo) - mycelium na klasu a listu pšenice (*Triticum aktivum* L.) (<http://www.blugen.org/index.php?page=powdery-mildews>; [http://www.fitopatoatlas.org.ar/publico/detalle.asp?id=2023&i\\_bib=True&i\\_loc=True&i\\_inf=True&i\\_sd=True](http://www.fitopatoatlas.org.ar/publico/detalle.asp?id=2023&i_bib=True&i_loc=True&i_inf=True&i_sd=True)).

V tabulce 4 jsou shrnuti zástupci řádů Peronosporales a řádu Erysiphales, jejich čeledí, hostitelských rostlin a popisu symptomů.

**Tab. 4** Zástupci peronospor (ř. Peronosporales) a padlí (ř. Erysiphales), jejich hostitelé a specifické symptomy (Mehrotra & Aggarwal, 2003; Agrios, 2005, Kalina & Váňa, 2005; Webster & Weber, 2007; Lebeda *et al.*, 2008)

Rod	Hostitel (rod)	Symptomy
<b>řád Peronosporales</b>		
<b>čeleď Albuginaceae</b>		
<i>Albugo amaranthi</i>	<i>Amaranthus</i>	bílé povlaky sporangií na listech a stoncích,
<i>A. candida</i>	<i>Capsella</i>	zelenání květů, deformace
<i>A. lepigoni</i>	<i>Spergulia</i>	
<i>A. tragopogonis</i>	<i>Tragopogon</i> , <i>Senecio</i>	

**Tab. 4** (Pokračování) Zástupci peronospor (ř. Peronosporales) a padlí (ř. Erysiphales)

Rod	Hostitel (rod)	Symptomy
<b>čeled' Peronosporaceae</b>		
<i>Basidiophora entospora</i>	<i>Aster</i>	žluté leze na listech ohraničené žilnatinou, na spodní straně listu je povlak konidioforů, v pozdějších fázích pletivo nekrotizuje
<i>Bremia lactucae</i>	<i>Lactuca</i> <i>Sonchus</i>	
<i>Graminivora graminicola</i>	zástupci čeledi Poaceae	
<i>Hyaloperonospora parasitica</i> (syn. <i>arabidopsidis</i> )	zástupci čeledi Brassicaceae	
<i>Paraperonospora leptosperma</i>	<i>Coleostephus</i> <i>Chamomilla</i>	
<i>Perofascia lepidii</i>	<i>Allium</i>	
<i>Peronosclerospora heteropogonis</i>	<i>Heteropogon</i>	
<i>P. noblei</i>	<i>Saccharum</i>	
<i>P. sacchari</i>	<i>Saccharum</i>	
<i>P. sorghi</i>	<i>Sorghum</i>	
<i>Peronospora alta</i>	<i>Plantago</i>	
<i>P. aestivalis</i>	<i>Medicago</i>	
<i>P. affinis</i>	<i>Fumaria</i>	
<i>P. agrestis</i>	<i>Veronica</i>	
<i>P. arborescens</i>	<i>Papaver</i>	
<i>P. agrostemmatidis</i>	<i>Agrostema</i>	
<i>P. brassicae</i>	<i>Brassica</i>	
<i>P. destructor</i>	<i>Allium</i>	
<i>P. farinosa</i> (syn. <i>variabilis</i> )	špenát <i>Chenopodium</i> <i>album</i>	
<i>P. chenopodii</i>	<i>Chenopodium</i> <i>hybridum</i>	
<i>P. manshurica</i>	<i>Beta</i>	
<i>P. niessleana</i>	<i>Alliaria petiolata</i>	
<i>P. pisi</i> (syn. <i>viciae</i> )	<i>Pisum</i>	
<i>P. rubi</i> (syn. <i>sparsa</i> )	<i>Rubus idaeus</i>	
<i>P. rumicis</i>	<i>Rumex</i>	
<i>P. tabacina</i>	<i>Nicotiana</i>	
<i>Plasmopara angelicae</i>	<i>Angelica</i>	
<i>P. epilobii</i>	<i>Epilobium</i>	
<i>P. halstedii</i>	<i>Helianthus</i> , zástupci čeledi Asteraceae	
<i>P. nivea</i>	<i>Aegopodium</i>	
<i>P. pygmaea</i>	<i>Anemone</i>	
<i>P. pusilla</i>	<i>Geranium</i>	
<i>P. ribicola</i>	<i>Ribes</i>	
<i>P. viticola</i>	<i>Vitis</i>	
<i>Protobremia sphaerosperma</i>	<i>Tragopogon</i>	
<i>Pseudoperonospora cubensis</i> ( <i>P. humuli</i> )	<i>Cucumis</i> <i>Humulus</i>	
<i>P. urticae</i>	<i>Urtica</i>	
<i>Sclerophthora macrospora</i>	<i>Zea</i>	
<i>Sclerospora graminicola</i>	<i>Pennisetum</i>	
<i>Viennotia oplismeni</i>	zástupci čeledi Poaceae	

**Tab. 4** (Pokračování) Zástupci peronospor (ř. Peronosporales) a padlí (ř. Erysiphales)

Rod	Hostitel (rod)	Symptomy
<b>řád Erysiphales</b>		
<b>čeleď Erysiphaceae</b>		
<i>Blumeria graminis</i>	<i>Agropyron</i> , <i>Avena</i> , <i>Bromus</i> , <i>Dactylis</i> , <i>Festuca</i> , <i>Hordeum</i> , <i>Lolium</i> , <i>Secale</i> , <i>Triticum</i>	na nadzemních částech bílé povlaky mycelia s konidiofory jevící se jako pomoučené, vytváří se tmavá chasmothecia
<i>Erysiphe alphitoides</i>	<i>Quercus</i>	
<i>E. astragali</i>	<i>Astragalus</i>	
<i>E. cichoracearum</i> (syn. <i>Golovinomyces cichoracearum</i> )	<i>Trifolium</i> , <i>Pisum</i> , <i>Medicago</i> , <i>Aster</i> , <i>Achillea</i> , <i>Bellis</i> , <i>Lactuca</i>	
<i>E. heraclei</i>	<i>Heracleum</i> , <i>Aegopodium</i> , <i>Apium</i>	
<i>E. polygoni</i>	<i>Polygonum</i>	
<i>Leveillula taurica</i>	<i>Cynara</i> , <i>Cucumis</i> , <i>Helianthemum</i>	jasně žluté později až hnědnoucí skvrny, endofytické mycelium
<i>M. grossulariae</i>	<i>Ribes</i>	na nadzemních částech bílé povlaky mycelia s konidiofory jevící se jako pomoučené, vytváří se tmavá chasmothecia
<i>Podosphaera aucupariae</i>		
<i>P. clandestina</i>	<i>Crataegus</i>	
<i>P. leucotricha</i>	<i>Malus</i>	
<i>P. macularis</i>	<i>Humulus</i>	
<i>P. mors-uvae</i>	<i>Ribes</i>	
<i>P. myrtilina</i>	<i>Vaccinium</i>	
<i>P. pannosa</i>	<i>Rosa</i>	
<i>P. tridactyla</i>	<i>Prunus</i>	
<i>Phyllactinia fraxini</i>	<i>Fraxinus</i>	skvrny s povlakem mycelia, v pokročilém stádiu jsou vidět tmavá chasmothecia, endofytické mycelium
<i>P. guttata</i>	<i>Corylus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Aesculus</i> , <i>Betula</i> , <i>Ilex</i>	
<i>P. mali</i>	<i>Crataegus</i> , <i>Prunus</i>	
<i>Uncinula adunca</i> (syn. <i>Erysiphe adunca</i> )	<i>Salix</i>	na nadzemních částech bílé povlaky mycelia s konidiofory jevící se jako pomoučené, vytváří se tmavá chasmothecia
<i>U. bicornis</i>	<i>Acer</i>	
<i>U. clandestina</i>	<i>Ulmus</i>	
<i>U. necator</i>	<i>Vitis</i>	
<i>U. prunastri</i>	<i>Prunus</i>	

## **2. Metody identifikace rostlinných patogenů**

Diagnostika původců rostlinných patogenů je založena na kombinaci různých parametrů směřujících nespornému k určení daného patogena. Využívají se znalosti specifity interakce hostitel-patogen, symptomů a hlavně mikroskopické techniky (světelná mikroskopie), ultramikroskopické techniky (SEM) nebo je možno využít identifikace podle molekulárních markerů (Agrios, 2005).

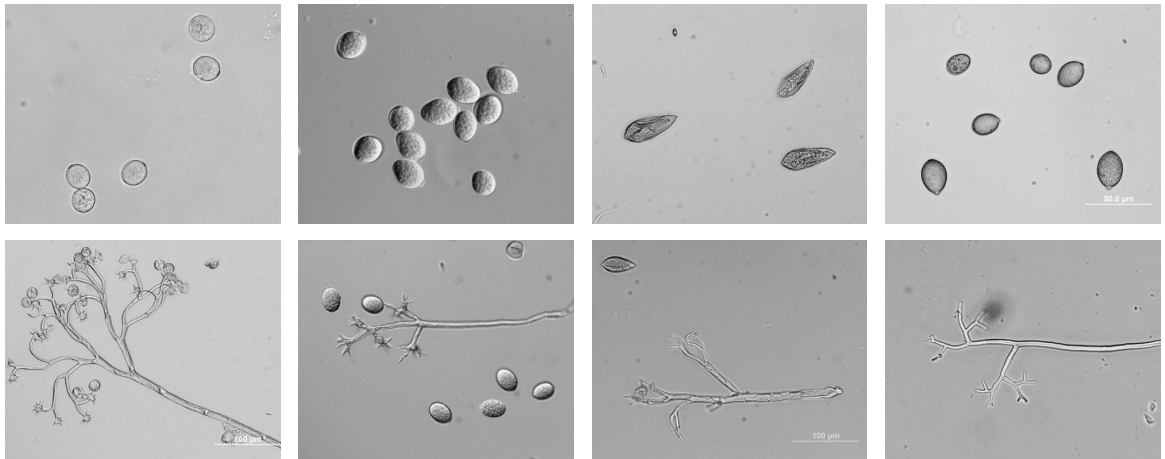
Přestože lze někdy diskutovat o variabilitě fenotypu, mikroskopické studie zůstávají ve fytopatologické praxi dosud nenahraditelnými metodami k určení původců mykóz. Zvláště z důvodu snadné přístupnosti a cenové dostupnosti. Výsledky jsou však velice závislé na zkušenostech a praxi fytopatologa. Analýzy molekulárních markerů jsou sice objektivní, ale jsou cenově náročnější, k analýze je třeba určité omezené množství vzorku a vyžaduje předběžnou identifikaci. Tyto bioanalytické techniky jsou časově náročné a neposkytují pohled na fyziologické vlastnosti organismů (Hall, 1996).

### **2. 1. Diagnostika na základě symptomů a pomocí srovnávací morfologie**

V zemědělství bylo v minulosti k charakterizaci patogenů využíváno symptomů, což bylo velice nepřesné, neboť se během patogeneze příznaky mění a často nemusí být pro danou chorobu specifické (Čača *et al.*, 1981).

Mnohem podstatnější pro určení fytopatogena jsou v dnešní době morfologicky odlišné infekční struktury, rozmnožovací orgány a pohlavní a nepohlavní spory (McCartney *et al.*, 2003). Existuje mnoho mikroskopicky identifikovatelných morfologických znaků, jež jsou stěžejní při charakterizaci a identifikaci. Mohou to být například morfologie plodnic, konidiosporangioforů a konidiosporangií a haustorií, barva, tvar, povrch spor.

K určení peronospor je například používáno mikroskopické pozorování (Obr. 19) konidiosporangií, kulovitých objektů, charakterizovaných hlavně podle tvaru (kulovité, oválné, vejčité, s nebo bez papil), stejně tak podle velikosti a povrchové textury (Sedlář *et al.*, 2009). Konidiosporangiofory, bývají charakterizovány zejména podle typu větvení (monopodiální, sympodiální, dichotomické, rozptýlené). V taxonomii peronospor bývá také přihlíženo na charakteristické symptomy, vazbu na hostitelskou rostlinu. Často bývá využíváno vedle světelné mikroskopie také skenovací elektronové mikroskopie (Thines, 2007).



**Obr. 19** Světelná mikroskopie konidiosporangií (nahore) a konidiosporangioforů (dole). Zleva doprava: *Bremia lactucae*, *Plasmopara halstedii*, *Peronospora destructor*, *Pseudoperonospora cubensis* (Sedlář *et al.*, 2009).

Padlí se častěji vyskytuje jak ve formě anamorfy, tak teleomorfy, proto se využívá k taxonomické identifikaci všech struktur (Braun, 1987). Bosewinkel (1977, 1980) poskytl první klíč ke klasifikaci padlí, později jej více propracovaly další skupiny (Shin & La, 1993; Shin & Zheng, 1998). Klíč byl založen na kombinaci více než 12 morfologických charakteristikách konidií, konidioforů, apresorií, haustorií, fibrosinových tělísek a mycelií. Nejčastěji byl dříve zohledňován charakter přívěsků (apendixů) na chasmotheciích, jejich počet větvení, délka, počet. Dnes je kladen hlavní důraz na tvar a charakter věceček, a další znaky anamorfního stádia, stejně jako u peronospor (Webster & Weber, 2007; Braun, 1995).

## 2. 2. Molekulárně biologické metody identifikace fytopatogenů

Diagnostika rostlinných patogenů pomocí molekulárně biologických metod zahrnuje například imunologické metody, technologii DNA/RNA prób, polymerázové řetězové reakce, („polymerase chain reaction“, PCR). Tyto techniky mají své výhody, například jsou přesnější než konvenční diagnostické metody, mohou být rychlejší a nevyžadují zkušenost fytopatologa (McCartney *et al.*, 2003).

Imunologické techniky jsou založené na rozeznání specifických antigenů na povrchu patogenů pomocí specifických protilátek. Fungují však pouze na úrovni rodů. A někdy je těžké a cenově nákladné vytvořit specifické protilátky (Bowman *et al.*, 2007; McCartney *et al.*, 2003). Velká výhoda technik využívajících DNA/RNA prób nebo PCR je jejich vysoká specifita. Mohou rozlišit jak odlišné druhy houbových organismů, tak i velice příbuzné druhy. Využívají se mimo jiné k určení specifických genetických vlastností, například, zda je patogen resistentní nebo citlivý k určitému fungicidu (McCartney *et al.*, 2003).



K analýzám jsou často využívána data odvozená od sekvencí genů podjednotek rDNA nebo rRNA. Malá podjednotka rRNA („small subunit rRNA“, SSU rRNA) nebo velká podjednotka rRNA („large subunit rRNA“, LSU rRNA) byly například využity v rámci říše Straminipili (Forster *et al.*, 1990; Leipe *et al.*, 1996, Van de Peer *et al.*, 1996, Van der Auwera *et al.*, 1995). Ale také sekvence rDNA jsou široce využívány, například 18S rDNA byla využita k potvrzení fylogeneze v rámci třídy Peronosporomycetes (Taylor, 1993; Bhattacharya & Medlin, 1995; Hibbit *et al.*, 1997; Dick *et al.*, 1999). LSU rDNA (28S) nebo i geny mitochondriální DNA (mtDNA), například COX2 sekvence jsou používány k identifikaci (Hudspeth *et al.*, 2000; Petersen & Rosendahl, 2000). Patogeny jsou také studovány analýzou ITS oblastí na rDNA nebo genu pro  $\beta$ -tubulin (McCartney, *et al.*, 2003).

Jak již bylo zmíněno výše, tyto uvedené techniky jsou ve srovnání s klasickým fytopatologickým přístupem velice pracovně, materiálově a časově náročné. Proto jsou hledány jiné možnosti a došlo k vývoji hmotnostně-spektrometrických technik pro rychlou identifikaci mikroorganismů, jako jsou viry, prvoci, bakterie, houby (Kemptner *et al.*, 2009a; Fenselau & Demirev, 2001).

### **2. 3. Identifikace a charakterizace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)**

Rychlá a nenáročná identifikace mikroorganismů nebo odlišení patogenních mikroorganismů od nepatogenních je v dnešní době důležitá v mnoha odvětvích. Například ve zdravotnictví, humánní a veterinární medicíně, při ochraně proti biologickým zbraním a bioterorismu, v bioinženýrství, biotechnologiích, potravinářském a farmaceutickém průmyslu, zemědělství (Fenselau & Demirev, 2001; Liu *et al.*, 2007; Kemptner *et al.*, 2009b).

Požadavky na rychlou, reprodukovatelnou identifikaci mikroorganismů pomocí metod s vysokým rozlišením, snadnou manipulací a možností automatizace splňuje hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“, MS).

Hmotnostní spektrometrie, jeden z významných nástrojů proteomiky, disciplíny zabývající se proteomem (soubor všech proteinů nacházející se v buňce, tkáni či organismu), se využívá k určení molekulové hmotnosti proteinů, peptidových fragmentů k sekvenční analýze, určení struktury a interakce molekulových komplexů a v poslední době bývá využívána k identifikaci a typizaci mikroorganismů na základě detekce jejich specifických a reprezentativních biomarkerů, iontů vznikajících během hmotnostně-spektrometrických analýz (Fenselau & Demirev, 2001; Vaidyanathan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007; Kemptner *et al.*, 2009b).

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí. Z iontového zdroje, který umožní ionizaci vzorku, hmotnostního analyzátoru rozdělujícího ionty na základě poměru  $m/z$  (hmota/náboj) a detektoru, který určuje jednotlivé ionty rozdělené analyzátozem. MS tedy přemění složky studované směsi v ionty, které jsou pak analyzovány na základě poměru  $m/z$  (Lieber, 2002).

### **2.3.1. Historie v oblasti identifikace a charakterizace pomocí MS**

#### **2.3.1.1. Tvrdé ionizační techniky MS**

Anhalt a Fenselau, v roce 1975, poprvé použili k charakterizaci bakterií MS v kombinaci s pyrolytickou ionizací elektronem. Získaná spektra umožnila mezi sebou rozlišit několik bakteriálních rodů, hlavně podle charakteristických fosfolipidů, ubichinonů a metachinonů a dalších látek s nízkou molekulární hmotností do 300 Da (Dalton). Díky silné fragmentaci tvrdé ionizační techniky bohužel poskytovala natolik málo informací, že umožnila rozlišovat pouze mezi rody, ale nebylo možno diferencovat jednotlivé druhy daných rodů (Anhalt & Fenselau, 1975).

#### **2.3.1.2. Měkké ionizační techniky MS**

Následně, během 80. let, se identifikace mikroorganismů pomocí MS rozvíjela spolu s příchodem dalších ionizačních technik, desorpčně-ionizačních technik - desorpce pomocí plasmu („plasma desorption“ - PD), desorpce pomocí laseru („laser/desorption ionization“, LDI) ionizace nárazem rychlých atomů („fast atom bombardement“, FAB), jež byly úspěšně použity například k analýzám polárních lipidů a fosfolipidů lyofilizovaných buněk. Hmotnostní rozsah produkovaných iontů biomarkerů se pohyboval již okolo 600 - 1000 Da (Heller *et al.*, 1987a; Heller *et al.*, 1987b). Přestože jsou tyto ionizační techniky považovány za měkké, stále neposkytovaly dostatečné informace o biomarkerech s větší molekulovou hmotností a před samotnou analýzou vyžadovaly složité preparační a extrakční postupy (Claydon *et al.*, 1996). Chromatografické metody, jak v on-line, tak v off-line spojení, bývají často použity před MS analýzou. Typické jsou experimenty Foxe *et al.*, jež demonstrovaly využití plynové chromatografie („gas chromatography“, GC) v on-line spojení s MS při diferenciaci bakterií rodu *Legionellae* charakterizací typických sacharidů (Fox *et al.*, 1990) a následně při rozlišení dvou velice příbuzných bakterií rodu *Bacillus* (*B. anthracis* a *B. cereus*) na základě jejich sacharidového profilu (Fox *et al.*, 1993).

S postupným vývojem dalších měkkých ionizačních technik - ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“, ESI) a laserová ionizace a desorpce za účasti matrice („matrix-assisted laser desorption/ionization“ - MALDI) už bylo možno identifikovat

a charakterizovat mikroorganismy na základě specifických biomarkerů o širokém rozmezí hodnot molekulových hmotností (Fenselau & Demirev, 2001; Liu *et al.*, 2007; Kemptner *et al.*, 2009a).

### 2.3.1.3. Výhody a nevýhody ESI-MS a MALDI-MS

Technika ESI byla využita například při detekci a charakterizaci kapsidových proteinů intaktních částic „cricket paralysis viru“ (CrPV), viru infikujícího bezobratlé (Desperieux *et al.*, 1996), jenž byl poprvé objeven v roce 1970 (Reiganum *et al.*, 1970) u australských cvrčků (z angl. „cricket“ - cvrček). Bothner a Siuzdak shrnuli, že obecně při studiu virů pomocí ESI lze využít nejen charakterizaci virálních proteinů, ale lze studovat i virální kapsidovou dynamiku, strukturu viru, a dokonce identifikovat nové virální receptory (Bothner & Siuzdak, 2004). Goodacre *et al.* jako první aplikovali ESI-MS k charakterizaci intaktních bakteriálních buněk a potvrdili možnou aplikaci i na těchto mikroorganismech větších než virové částice (Goodacre *et al.*, 1999). K rozlišení aerobních bakterií tvořících endospory (rod *Bacillus* a *Brevibacillus*) bylo rovněž využito analýz suspenze intaktních buněk pomocí ESI-MS (Vaidyanathan *et al.*, 2001).

Navzdory výhodám, které ESI-MS přináší - možnost online kombinace se separačními metodami, relativně přesnější určení hmotností velkých biomolekul, díky tvorbě mnohonásobně nabitých iontů, a reprodukovatelnost - má i určité nevýhody, jež velice souvisí s požadavkem na rychlou, nenáročnou techniku, poskytující jednoduchou interpretaci dat při identifikaci intaktních mikroorganismů (Vaidyanathan *et al.*, 2001; Kemptner *et al.*, 2009a). Tvorba mnohonásobně nabitých iontů komplikuje interpretaci dat, a neposkytuje tak celkový profil biomarkerů jednonásobně nabitých molekul jako je tomu například u ionizační techniky MALDI. Citlivost na soli, pufrů a detergentů opět ESI-MS posouvá až na druhé místo v souvislosti s požadavkem na rychlou přípravu vzorku (Welham *et al.*, 1998; Fenselau & Demirev, 2001). Z obecných zkušeností mají suspenze intaktních buněk či spor tendenci ucpávat zařízení elektrospreje (Fenselau & Demirev, 2001).

Zmiňované požadavky při analýze, identifikaci a charakterizaci intaktních mikroorganismů nejlépe splňuje ionizační technika MALDI, jež poskytuje snadnou a rychlou interpretaci dat díky převažujícímu vzniku jednonásobně nabitých iontů a ve spojení s průletovým analyzátozem („time-of-flight“, TOF) pokrývá široké (v principu neomezené) rozmezí hodnot  $m/z$ . Tolerance k solím a detergentům umožňuje nenáročnou přípravu vzorku, kterým je obvykle suspenze intaktních spor, buněk nebo částic mikroorganismů bez předešlé úpravy, například lýzy, extrakce a separace biomolekul (Fenselau & Demirev, 2001; Kemptner *et al.*, 2009a; Kemptner *et al.*, 2009b).

### 2.3.2. MALDI-MS intaktních mikroorganismů

Měkká ionizační technika MALDI umožňuje vysoce rychlou a reprodukovatelnou hmotnostně-spektrometrickou analýzu získávání profilů biomarkerů přímo z nerozrušených buněk či spor mikroorganismů (viry, bakteriální a houbové vegetativní buňky nebo spory). Za optimalizovaných podmínek může jedna analýza trvat méně než 5 minut.

Technika MALDI poskytuje nedestruktivní odpaření a ionizaci velkých i malých biomolekul. Analyt kokrystalizuje s matricí, která je v nadbytku (většinou je to slabá organická kyselina absorbující UV-záření) a ten se většinou po ozáření laserem vypaří. Plynná matrice nese analyt. Zprostředkovává protonizaci nebo deprotonizaci, a tím ionizaci analytu (Lewis *et al.*, 2000).

Pojem „intaktní“ znamená, že při identifikaci pomocí MALDI-TOF MS se pracuje s buňkami mikroorganismů, jež jsou neporušené, jsou pouze suspendované v roztoku (nejčastěji voda). Přímou takto se nanáší na destičku či nosič pro MS analýzu. Ve skutečnosti dochází při kontaktu s vodou, organickým rozpouštědlem nebo silnou kyselinou, přítomných v roztoku matrice, k lýzi většiny vegetativních buněk. Silné organické kyseliny nebo alkoholy se proto také často přidávají v oddělených krocích k lýzi virů, bakteriálních spor nebo kvasinek.

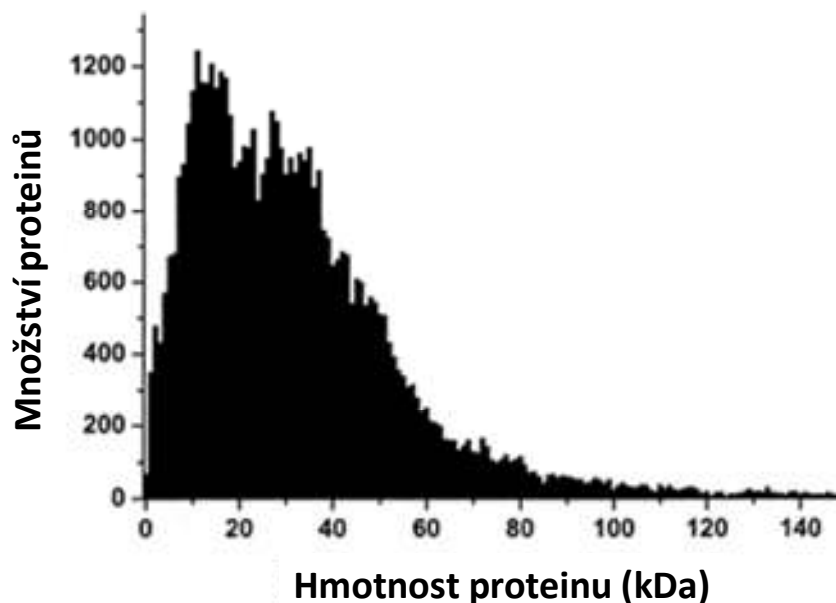
Za účelem zesílení signálu biomarkerů se mohou použít i jiné fyzikální nebo chemické metody, bývají aplikovány po velice krátkou dobu (méně než 5 minut) na suspenzi nanesenou přímo na destičce nebo těsně před nanesením, bez jakékoliv frakcionace. Analýza takto komplexních vzorků může přispět k potlačení nebo interferenci signálu (Fenselau & Demirev, 2001).

#### 2.3.2.1. MALDI-TOF spektra biomarkerů

Je obecně známo, že látky desorbované přímo z nerozrušených buněk a analyzované z MALDI spekter nad hodnotou 4000 Da, jsou intaktní proteiny. Většina proteinů kódovaných bakteriálními buňkami spadá do rozmezí hodnot 4000-15000 Da (Obr. 20). Kde výčet prokaryotických proteinů, nalezených v SwissPROT databázi, je funkcí molekulových hmotností (Demirev *et al.*, 1999).

Jak je již zmíněno výše, vývoj různých typů biomarkerů, jež mohou být pomocí MS detekovány, šel paralelně s vývojem ionizačních technik. Polární lipidy zahrnující zhruba 15 rodin jsou zastoupeny z 5-8 % v sušině vegetativní bakteriální buňky. Proteiny zastupují 50 % suché váhy rozložené do 200-6000 molekulárních rodin bakterií. Různorodost RNA molekul převyšuje tu proteinovou více než dvakrát, ale hmotnost zastoupení je pouze okolo 0.01% suché váhy. U spor jsou RNA molekuly zastoupeny asi 1 % suché váhy. DNA, jako nejunikátnější biomarker pro každou bakterii, je bez jakékoliv amplifikace zastoupena jednou kopií na buňku. Při současné instrumentaci jsou proteiny nejcharakterističtější přístupné

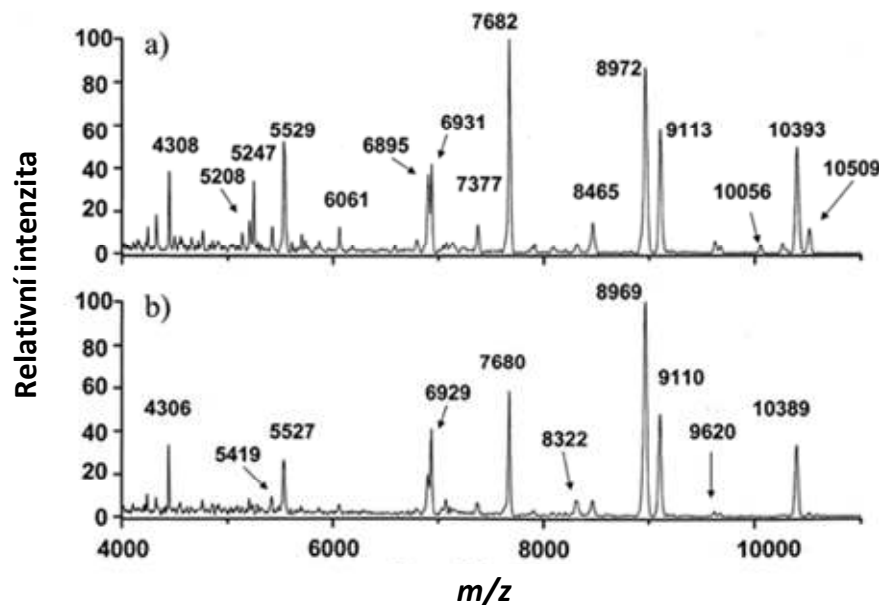
biomarkery při analýzách intaktních organismů, jež nebyly podrobeny extrakčním, separačním či amplifikačním procesům (Fenselau & Demirev, 2001).



**Obr. 20** Distribuce molekulových hmotností proteinů všech prokaryotických proteinů uložených v databázi SwissPROT (převzato z Demirev *et al.*, 1999).

#### 2.3.2.2. *Instrumentace*

Ve spojení s pulzními laserovými zdroji jsou pro detekci intaktních mikroorganismů TOF analyzátoři velice vhodné. Poprvé byly použity již v roce 1987 (Heller *et al.*, 1987b). Nabízí možnost rychlé analýzy, tandemové MS a miniaturizace. Další výhodou kombinace MALDI-TOF je schopnost jednoduše analyzovat jak pozitivní, tak negativní ionty desorbované ze stejného vzorku (Obr. 21). Detekce iontů v obou modech umožňuje lepší kalibraci biomarkerů a zvyšuje identifikační specifitu (Christian *et al.*, 2000).



**Obr. 21** MALDI-TOF MS spektra intaktní bakterie *Helicobacter pylori* v rozmezí hodnot  $m/z$  4000 - 1000 v pozitivním (a) a negativním (b) módu. Výsledné profily byly získány akumulací 50 spekter ( $N_2$  laser o vlnové délce 337 nm) - vzorek obsahoval  $2 \times 10^5$  intaktních buněk suspendovaných v acetonitrilu/0.1% trifluoroctové kyselině (70/30, v/v) nanášených spolu s kyselinou sinapovou (0.05 M) jako matricí (převzato z Demirev *et al.*, 2001).

Většina MALDI-TOF přístrojů používaných při identifikaci mikroorganismů je vybavena ultrafialovým (UV) dusíkovým laserem při 337 nm. Některé práce se zabývaly detekcí mikroorganismů pomocí hmotnostních spektrometrů vybavených infračerveným laserem (IR). Dokonce bylo potvrzeno, že laser s oxidem uhličitým ( $10.6 \mu\text{m}$ ) dokáže desorbovat fosfolipidové biomarkery z intaktní bakterie bez použití matrice (Heller *et al.*, 1987b). Nd-YAG (izotropní krystal Yttrium Aluminium Granátu,  $Y_3Al_5O_{12}$ , dopovaný ionty neodymu  $Nd^{3+}$ ) laser při vlnové délce  $1.064 \mu\text{m}$  je také účinný při produkci fosfolipidových a lipopeptidových biomarkerových iontových profilů z intaktních bakterií a spor suspendovaných v roztoku matrice, například glycerolu s nanočásticemi kobaltu (Ho & Fenselau, 1998).

Porovnání UV a IR laseru bylo aplikováno při MALDI analýze na purifikované spory *Bacillus subtilis*, *B. cereus* a *B. globigii*. IR MALDI spektra vykazovala větší množství a širší rozmezí hodnot  $m/z$  biomarkerových píků detekovaných nad hodnotou  $m/z$  4000 v porovnání s UV MALDI. (Ryzhov *et al.*, 2000a). IR laser s variabilní vlnovou délkou v rozmezí od  $3.05$  do  $2.8 \mu\text{m}$  byl testován k přímé desorpci (bez použití matrice) biomarkerových iontů z intaktních spor různých druhů bakterií rodu *Bacillus*. Pomocí lineárního TOF analyzátoru byly detekovány ionty v rozmezí hodnot  $m/z$  od několika stovek do 20000. Nejvyšší výtěžek iontů pro různé bakteriální biomarkery byl získán při laseru o vlnové délce  $3.05 \mu\text{m}$  (Ullom *et al.*, 2001).

### 2.3.2.3. Vzorek a jeho příprava

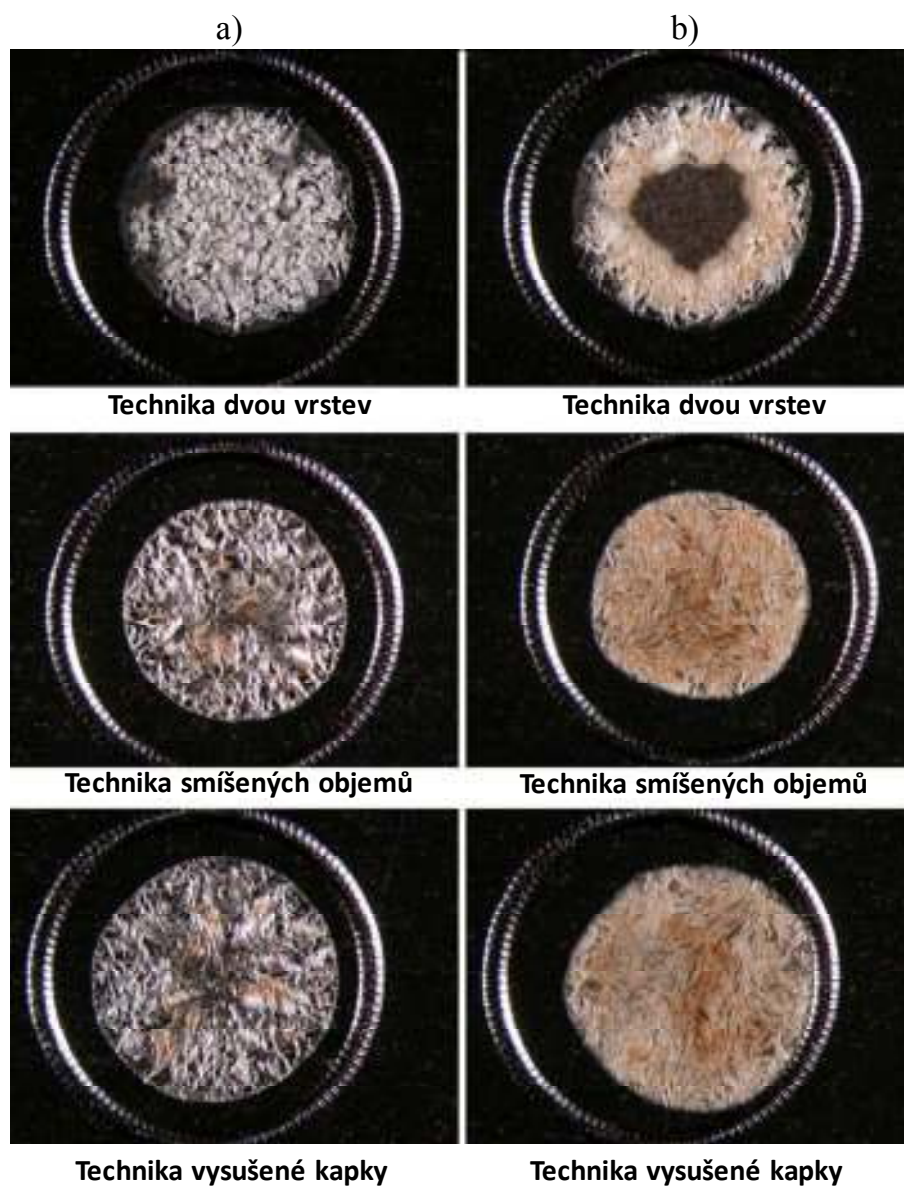
Analyzovaný materiál (víry, spory a vegetativní buňky bakterií a hub) se před samotným měřením získává z různého prostředí. Mohou to být mikroorganismy žijící ve vzduchu, ve vodě nebo jsou přítomny ve fyziologických tekutinách, parazitují na živočišných či rostlinách nebo žijí v půdě. Nejreprodukovatelnější metoda, je pěstování například bakteriálních kolonií přímo na živném médiu (Holland *et al.*, 1996; Welham *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1999; Madonna *et al.*, 2000; Evason *et al.*, 2001). Vzorek je pak nanesen přímo na MALDI destičku a přidána matrice. Tento přístup umožňuje přidávat konstantní množství matrice k definovanému množství vzorku a takto získávat reprodukovatelná spektra (Fenselau & Demirev, 2001).

Příprava vzorku (výběr matrice, koncentrace matrice, organického rozpouštědla, techniku nanášení vzorku na destičku) pro optimalizaci citlivosti, reprodukovatelnosti a přesnosti je stejně zásadní při identifikaci intaktních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS jako při jiných aplikacích této metody. Jediná značná odlišnost mezi MALDI analýzou proteinů a mikroorganismů je dodatečný proces disrupce nebo narušení struktury buněčných stěn. Nejčastěji jsou používány silné organické kyseliny (Thomas *et al.*, 1998), trifluoroctové, TFA (Karty *et al.*, 2000; Scholl *et al.*, 1999; Ryzhov *et al.*, 2000b) nebo mravenčí (Wang *et al.*, 1998; Madonna *et al.*, 2000) jako přídavek před nebo přímo s nanesením roztoku matrice. Například přídavek methanolu (Wang *et al.*, 1998; Winkler *et al.*, 1999; Evason *et al.*, 2000) nebo ethanolu (Madonna *et al.*, 2000) zesiluje signál u biomarkerů s vyšší molekulovou hmotností (nad 15 kDa, kilodaltonů). Také bylo zjištěno, že ethanol může zvyšovat stabilitu vzorku před analýzou MALDI ve srovnání s TFA (Winkler *et al.*, 1999).

Fyzikální metody k zesílení signálu (výboj koronární plasm, rozmrazování-zmrazování, ultrasonikace byly v mnoha publikacích demonstrovány (Birmingham *et al.*, 1999; Magnuson *et al.*, 2000; Cain, *et al.*, 1994; Hathout *et al.*, 1999). Těsně před přídavkem matrice je možno nechat působit enzymy na vzorky spor či buněk mikroorganismů (zvláště virů). Například pro deglykosylaci glykosylovaných proteinů (Kim *et al.*, 2001) nebo proteolýzu trypsinem (Siuzdak *et al.*, 1996; Phinney *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2001).

Technika nanášení vzorku (Obr. 22) - vysušená kapka („dried-droplet“), tenká vrstva („thin-layer“), sendvičová technika, smíšené objemy („mixed volume“), technika dvou vrstev („two-layer“) - a výběr matrice byly hodnoceny v mnoha laboratořích (Kemptner *et al.*, 2009a; Kemptner *et al.*, 2009b; Dong *et al.*, 2009). Povaha detekovaného biomarkeru může být ovlivněna výběrem techniky nanášení vzorku a matrice. Matrice vhodné pro detekci proteinových biomarkerů jsou například CHCA ( $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina), SA (sinapová kyselina) a FA (ferulová kyselina). I u těchto matic však záleží s jakými konkrétními mikroorganismy je pracováno a jaká rozmezí hodnot  $m/z$  jsou požadována (Fenselau & Demirev, 2001).

Další parametry, co mohou ovlivnit výsledná spektra je poměr vzorek k matici a množství materiálu nanášeného na destičku (Ramirez & Fenselau, 2001).



**Obr. 22** Mikroskopie spotů kokrytalizace matrice se sporami plísně rodu *Fusarium* připravených různými technikami. Panel (a) *F. poae*, rasa 278; panel (b) *F. graminearum*, rasa 2765.

#### 2.3.2.4. Charakterizace MALDI biomarkerů a proteomické přístupy

První snaha o kvalitativní charakterizaci mikroorganismů pomocí MALDI-MS spekter byly založeny na tabelování a srovnávání hodnot hmotností biomarkerů jednotlivých organismů patřících do odlišných rodů (Holland *et al.*, 1996), čeledí (Lynn *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1999; Ryzhov *et al.*, 2000b) nebo kmenů (Nilsson, 1999). V těchto případech záleželo hlavně na reprodukovatelnosti získaných hodnot  $m/z$  než intenzitách píků (Fenselau & Demirev, 2001).



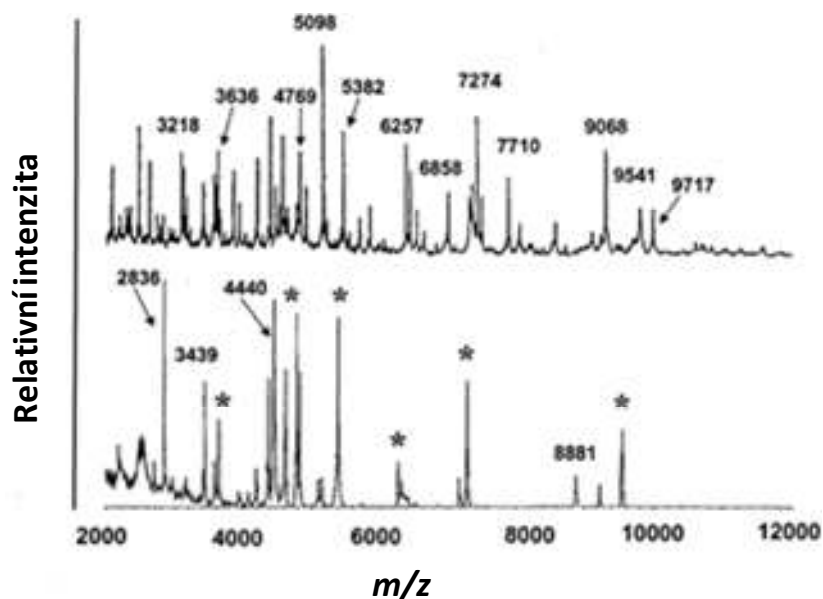
Postupně se však začaly vyvíjet počítačové programy k diferenciaci organismů i na základě kvantitativních hodnot a jsou sestavovány knihovny referenčních hmotnostních spekter (Fenselau & Demirev, 2001). Další programy založené na bioinformatických přístupech dovedou charakterizovat mikroorganismy na základě přiřazení proteinových molekulových hmotnostní daného profilu k molekulovým hmotnostem předpovězeným z genomových sekvencí (Demirev *et al.*, 1999; Pineda *et al.*, 2000). Tato metoda výslovně využívá skutečnosti, že hodnoty biomarkerů intaktních mikroorganismů MALDI spekter nad hodnoty  $m/z$  okolo 4000 jsou proteiny. Tato aplikace je nicméně závislá na tom, zda byl již genom daného mikroorganismu sekvencován (Fenselau & Demirev, 2001).

Mikroorganismy mohou být také identifikovány na základě takzvaného peptidového mapování („peptide mass fingerprinting“, PMF) z hmotnostních spekter směsi definovaných proteolytických peptidů vzniklých enzymatickým štěpením studovaných proteinových biomarkerů (Bothner *et al.*, 1998; Krishnamurthy *et al.*, 2000a; Yao *et al.*, 2001). Nebo z fragmentů proteinových biomarkerů získaných pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie fragmentací přímo v hmotnostním spektrometru (Xiang *et al.*, 2000; Cargile *et al.*, 2001). Algoritmus vyhledávání je pak založen na softwarovém srovnávání sady molekulových hmotností těchto peptidů nebo fragmentů s teoretickými štěpy proteinů (Fenselau & Demirev, 2001).

### **2.3.3. Aplikace MALDI-MS při identifikaci intaktních bakterií**

Díky velkému významu v lékařské sféře, národní bezpečnosti nebo potravinářském průmyslu se zpočátku mnoho vědeckých prací zaměřovalo na klasifikaci a identifikaci bakterií a bakteriálních spor. Využití MALDI-TOF MS k diferenciaci bakterií na základě proteinů bylo poprvé publikováno v roce 1994. Proteiny byly sice izolovány z buněk narušením buněčné stěny a z tohoto surového extraktu byly separovány pomocí chromatografie v off-line spojení s MS. Jedná se však o první práci, kde studované bakteriální biomarkery jsou převážně proteiny, na rozdíl od malých molekul studovaných dříve při použití pyrolýzy nebo desorpce laserem (Cain *et al.*, 1994).

Charakterizaci bakterií na základě proteinových profilů získaných pomocí MALDI-TOF-MS přímo z intaktních bakteriálních buněk poprvé demonstroval ve své práci Holland *et al.* (1996). Další srovnatelné studie, publikované krátce poté v jiných laboratořích (Obr. 23), jen potvrdily potenciální použití této techniky k identifikaci mikroorganismů z celých intaktních buněk (Holland *et al.*, 1996; Claydon *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 1996). Na základě toho byla MALDI-TOF MS použita například k rozlišení 25 blízce příbuzných druhů bakterie *Escherichia coli* (Arnold & Raily, 1998) nebo k potvrzení, že mohou být získána reprodukovatelná spektra z různých laboratoří (Wang *et al.*, 1998).



**Obr. 23** Porovnání pozitivních MALDI spekter stejného kmene *E. coli* (ATCC 11775) kultivované v jiných laboratořích. Spektra jsou získána za stejných experimentálních podmínek. Spektrum analýzy Wanga *et al.*, 1998 (nahore), spektrum naměřeno na Univerzitě v Marylandu (dole). Hvězdičky v dolním spektru označují překrývající se píky (Fenselau & Demirev, 2001).

Jelikož každá práce využívá různých způsobů zpracování vzorků k MALDI-TOF MS analýzám, bylo třeba najít metodu pro přípravu vzorku různých mikroorganismů k usnadnění a sjednocení práce mezi jednotlivými laboratořemi. Liu *et al.* vyvinuli univerzální metodu pro identifikaci Gram-pozitivních, Gram-negativních bakterií, bakterií tvořících i netvořících spory. Protokol je jednoduchý, rychlý a snadno proveditelný s výbornou reprodukovatelností, vhodný ke konstrukci databází, které mohou pomoci k identifikaci. Optimalizovány byly tyto parametry (Tab. 5): množství bakterií, rozpouštědla vhodná pro matrice a suspenze bakterií, matrice, techniky nanášení vzorku a matrice (Liu *et al.*, 2007).

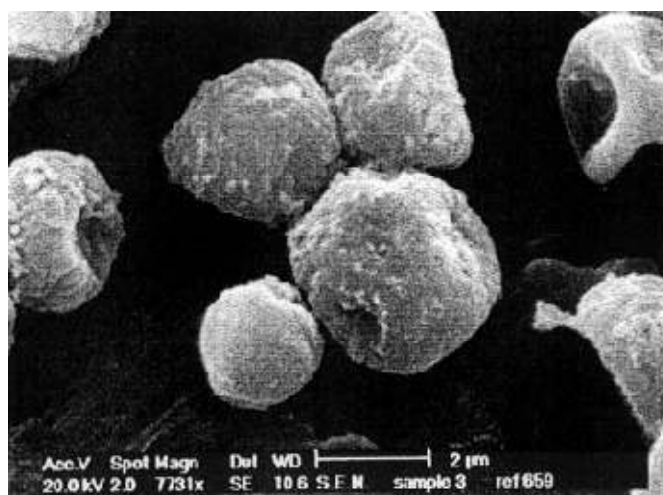
**Tab. 5** Roztoky použité při optimalizaci pro ošetření intaktních bakterií a rozpuštění matrice pro MALDI analýzu (přepřevládáno z Liu *et al.*, 2007)

Typ a složení rozpouštědla	Označení
<b>Rozpouštědlo pro vzorek</b>	
0.1% trifluoroctová kyselina (TFA)	I
Chloroform: methanol (1:1)	II
Propano-2-ol : acetonitril (1:1)	III
Kyselina mravenčí: propan-2-ol : voda (1:2:3)	IV
Chloroform: propan-2-ol	V
<b>Rozpouštědlo matrice</b>	
Acetonitril: methanol: voda (1:1:1) s 0.1% kyselinou mravenčí a 0.01 M 18-crown-6*	A
Acetonitril: ethanol: voda (1:1:1) s 0.1% kyselinou mravenčí a 0.01 M 18-crown-6*	B
Propan-2-ol : voda (1:1)	C
Acetonitril: voda (1:2) obsahující 0.1% TFA	D
Acetonitril: voda (2:1) obsahující 0.1% TFA	E

#### 2.3.4. Aplikace MALDI-MS při identifikaci intaktních mikroskopických hub

Nejen bakterie, ale i mikroskopické houby (mikromycety) jsou předmětem zájmu a studia v různých odvětvích a jejich rychlá a přesná identifikace je v mnoha případech stěžejní. Zatímco charakterizace bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie je v dnešní době úspěšně používaná rutinní metoda, charakterizace intaktních buněk a spor hub nebyla zatím důkladně tolik popsána. Buňky a spory těchto organismů se totiž od těch bakteriálních liší. Jsou větší a mají odlišné složení buněčné stěny. Z 80-90 % je tvořena polysacharidy, jako je chitin (říše Fungi) nebo celuloza (říše Chromista), jež dávají těmto buňkám pevnost a strukturní stabilitu. Také peptidy, proteiny, lipidy a polyfosfáty spolu s anorganickými ionty jsou součástí buněčné stěny (Welham *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Existuje několik vědeckých skupin, které se této problematice věnují. Na základě postupů a technik využívaných pro identifikaci bakterií se snaží vyvinout a přizpůsobit postupy pro identifikaci houbových organismů (Welham *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Valentine, *et al.*, 2002; Chen & Chen, 2005; Kemptner, *et al.*, 2009a, Kemptner, *et al.*, 2009b).

Využití MALDI-TOF MS k přímé analýze spor plísní bylo potvrzeno při studiu a vývoji metody pro identifikaci spor plísně rodu *Penicillium* (Welham *et al.*, 2000).



**Obr. 24** Skenovací elektronová mikroskopie plísně rodu *Penicillium* (převzato z Welham *et al.*, 2000).

Další práce se věnuje rozlišení aflatoxigenních a neaflatoxigenních druhů rodu *Aspergillus* (Li *et al.*, 2000). Jiné studie potvrdily použití proteinových biomarkerů k identifikaci a rozlišení kvasinek rodu *Saccharomyces*, *Candida* a *Epidermophyton* (Amiri-Eliasi & Fenselau, 2001). Intaktní spory plísní *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma reesei* a *Phanerochaete chrysosporium* byly podrobeny analýzám k optimalizaci metody pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS. Práce hodnotila parametry jako - nutnost předešlé úpravy vzorku, vliv matrice, způsob sběru vzorku, způsob nanášení vzorku. Opět se potvrzuje použití MALDI-TOF MS jako účinného nástroje k přímé analýze těchto mikroorganismů (Valentine *et al.*, 2002). Chen & Chen prezentovali rychlou identifikaci patogenů citrusových plodů a jablek. K přímému určení těchto patogenů využili biomarkerů (Tab. 6) předem získaných MALDI-TOF MS analýzou šesti různých patogenních druhů plísně rodu *Penicillium* (Chen & Chen, 2005).

**Tab. 6** Seznam biomarkerových iontů spor plísně rodu *Penicillium* získaných pomocí MALDI-TOF analýzy (přepřacováno z Chen & Chen, 2005)

Druh	Ionty biomarkerů ( <i>m/z</i> )
<i>Penicillium expansum</i>	2662, 2880, 3267, 5676, 7242
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3140, 51373
<i>Penicillium italicum</i>	2994
<i>Penicillium digitatum</i>	2600, 5211, 7378
<i>Penicillium citrinum</i>	2981, 4988
<i>Penicillium pinophilum</i>	4495, 6069

Ze všech předešlých prací vyplývá, že pro úspěšnou klasifikaci a identifikaci mikroskopických hub, plísní a houbám podobných organismů jsou velice důležité dva předpoklady - dosažitelná data hmotnostních spekter specifických profilů (hodnoty *m/z* a jejich relativní intenzity) a reprodukovatelnost metody. Veškeré úsilí skupin zaměřujících se na tuto

problematiku se uchyluje k optimalizacím parametrů, které tyto dva předpoklady ovlivňují (Kemptner *et al.*, 2009a; Kemptner *et al.*, 2009b).

Plíseň rodu *Fusarium*, významný patogen zemědělsky důležitých plodin v Evropě, jako je kukuřice, pšenice nebo proso, se taktéž stal předmětem zájmů. Byla vyvinuta rychlá a reprodukovatelná metoda přípravy vzorku, pro MALDI-TOF identifikaci intaktních spor plísně rodu *Fusarium* a na pěti různých druzích tohoto rodu (Tab. 7) byla tato optimalizovaná metoda aplikována (Kemptner *et al.*, 2009a) a později zdokonalena vyvinutím techniky smíšených objemů („mixed volume“), která ještě víc zvyšuje reprodukovatelnost (Kemptner *et al.*, 2009b). Následně tato práce rozvíjela i pro analýzu a identifikaci druhů, jež vytváří barevné spory (v případě *Fusaria* oranžové až červeno-hnědé) a jsou obtížněji analyzovatelné při použití předešlých metod přípravy (Dong *et al.*, 2009).

**Tab. 7** Studované druhy plísně rodu *Fusarium*, jejich CBS kód (číslo, pod kterým je izolát veden v Centrální knihovně kultur hub, Leiden, Nizozemsko), hostitel a země původu (přepřacováno z Kemptner *et al.*, 2009)

Druh	Číslo izolátu	CBS kód	Hostitel	Původ
<i>Fusarium graminearum</i>	C.P.K. 2785	CBS 110271	kapradina	Nizozemsko
<i>Fusarium poae</i>	C.P.K. 2786	CBS 115696	<i>Triticum eastivum</i>	Polsko
<i>Fusarium sporotrichioides</i> var. <i>sporotrichioides</i>	C.P.K. 2787	CBS 115700	<i>Fagopyrum</i> <i>aesculantum</i>	Polsko
<i>Fusarium culmorum</i>	C.P.K. 2789	CBS 110262	proso	Maďarsko
<i>Fusarium cerealis</i>	C.P.K. 2790	CBS 110268	jáhly	Polsko

Práce Šulce *et al.* se věnuje optimalizaci podmínek pro MALDI-TOF MS identifikaci a extrakčním postupům pro analýzu proteinů pomocí 1-D SDS PAGE (jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného), jež by měla potvrdit a doplnit informace získané pomocí MS. Analýzou intaktních spor plísní rodu *Aspergillus* pomocí MALDI-TOF MS byla sestavena databáze 24 zástupců tohoto rodu (Tab. 8). Mimo jiné bylo 11 proteinů (v rozmezí 5-25 kDa) získaných z 1-D SDS PAGE ze tří vybraných druhů podrobeno identifikaci (Šulc *et al.*, 2009).

**Tab. 8** Studované druhy rodu *Aspergillus* (přepřacováno z Šulc *et al.*, 2009)

Název druhu	Číslo	Zdroj	Rok izolace
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF3227	laboratorní vzduch	2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF1187	krk pacienta	1970
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GR-1	aspergilom myši	2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CZ-2	aspergilom myši	2001
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF3623	lidská dutina čelistní	2003
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF1293	hrtan horníka	1968
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF1292	hrtan horníka	1967
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CCF1059	kořen cukrové řepy	1965
<i>Aspergillus niger</i>	MZ-3	laboratorní vzduch	2002
<i>Aspergillus niger</i>	CCF3264	plíseň z pšeničné mouky	1999
<i>Aspergillus niger</i>	CCF2477	patentovaný izolát	1967
<i>Aspergillus niger</i>	CCF1297	hrtan horníka	1967
<i>Emericela nidulans</i>	CCF3379	lidský zvukovod	2003
<i>Emericela rugulosa</i>	CCF3089	lidský perikard	1998
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CCF1893	jeskynní vzduch	1983
<i>Aspergillus flavipes</i>	CCF2026	z archivů	1986
<i>Aspergillus flavus</i>	CCF3201	černý čaj	2000
<i>Aspergillus flavus</i>	CCF2497	semenáček cizrny beraní ( <i>Cicer arietinum</i> )	1987
<i>Aspergillus flavus</i>	CCF1288	hrtan horníka	1967
<i>Aspergillus flavus</i>	CCF1058	kořen cukrové řepy	1965
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CCF3137	půda z tropického deštného pralesa	2000
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CCF1299	hrtan horníka	1967
<i>Aspergillus oryzae</i>	CCF1602	jídlo	1977
<i>Aspergillus oryzae</i>	CCF1066	ATCC10063	1996

Legenda: CCF. Culture Collection of Fungi; ATCC, American Type of Culture Collection GR-1, CZ-2 a MZ-3 jsou houbové izobáty z vlastních sbírek (GR-1, CZ-2 byly poskytnuty M. Hajdúchem, MZ-3 M. Žabkou)

#### 2.3.4.1. Proteomické analýzy mikroskopických hub

V posledních letech se začíná rozvíjet proteomický výzkum hub, jež jsou významné lidské nebo rostlinné patogeny nebo slouží v biotechnologickém průmyslu k produkci širokého množství terapeutik či chemikálií (Carlile *et al.*, 2001). Pro lepší porozumění a studium těchto organismů se rozvíjejí proteomické přístupy, jež hlouběji analyzují lokalitu studovaných proteinů, postranlační modifikace, jež mohou napomoci porozumění přenosu signálu (Pandey & Mann, 2000).

Například vláknité houby, kde patří výše zmiňované padlí (říše Fungi), a oomycety, jejichž součástí jsou vzpomínané peronosporý (říše Chromista) jsou zodpovědné za vážná onemocnění rostlin, a proto se využívá proteomických nástrojů ke studiu molekulárních mechanismů popisujících vývoj hub (morfogenezi související s infekcí) nebo interakce

mezi rostlinným hostitelem a houbou nebo oomycetou či samotnou fytopatogenezi, sekretomu, virulence nebo proteiny exprimované mimo rostlinu (*ex planta*) za odlišných podmínek (Bhadoria *et al.*, 2010).

Mezi první proteomické studie peronospor patří analýza kompatibilních interakcí mezi *Peronosporou viciae* a její hostitelskou rostlinou hrachem setým (*Pisum sativum*). Pomocí analýz studujících změny při infekci bylo identifikováno několik proteinů, jež se podílejí na interakcích (Amey *et al.*, 2008). První proteomická analýza biotrofních hub patřící mezi padlí byla provedena na velice významném patogenu ječmene *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Tato studie byla zaměřena na neklíčící konidiofory. Kombinací metod dvourozměrné gelové elektroforézy, s MALDI-TOF MS a tandemové hmotnostní spektrometrie bylo možno identifikovat 180 proteinů a sestavit proteomovou mapu (Noir *et al.*, 2009).

# *Experimentální část*



### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Biologický materiál

Použité fytopatogeny (peronospory a padlí) a jejich hostitelské rostliny jsou shrnuty v tabulkách 9 a, b. Rostlinný materiál se symptomy mykóz byl získán buď sběrem napadených rostlin v terénu nebo ze sbírky UPOC (Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci), která je součástí Národního programu genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu (NPGZM) podporovaného MZe ČR (Ministerstvo zemědělství České Republiky). Isoláty patogenů jsou udržovány a množeny na hostitelských rostlinách nebo zamraženy na hostitelských pletivech.

**Tab. 9a** Seznam peronospor, jejichž proteinové profily byly studovány pomocí MALDI-TOF MS, jejich hostitelských rostlin a původ nebo lokalita jejich sběru

Název	Hostitelský druh - latinsky	Hostitelský druh - česky	Původ - lokalita
<i>Bremia lactucae</i> (rasa* BL 16)	<i>Lactuca sativa</i> cv. Cogham Green	locika salát	Sbírka UPOC
<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> (syn. <i>Peronospora parasitica</i> )	<i>Brassica oleracea</i>	brukev zelná	Sbírka UPOC
<i>Peronospora chenopodii</i>	<i>Chenopodium hybridum</i>	merlík zvrhlý	Lednice
<i>Peronospora niessleana</i>	<i>Alliaria petiolata</i>	česnáček lékařský	Kostelec n. Hané
<i>Peronospora rubi</i>	<i>Rubus idaeus</i>	maliník obecný	Bouzov
<i>Peronospora variabilis</i>	<i>Chenopodium album</i>	merlík bílý	Lednice
<i>Plasmopara halstedii</i>	<i>Helianthus annuus</i>	slunečnice roční	Podivín
<i>Plasmopara nivea</i>	<i>Aegopodium podagraria</i>	bršlice kozí noha	Huslenky
<i>Plasmopara pusilla</i>	<i>Geranium pratense</i>	kakost luční	Huslenky
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	<i>Cucumis sativus</i> cv. Stela	okurka obecná	Sbírka UPOC

**Tab. 9b** Seznam padlí, jejichž proteinové profily byly studovány pomocí MALDI-TOF MS, jejich hostitelských rostlin a původ nebo lokalita jejich sběru

Název	Hostitelský druh - latinsky	Hostitelský druh - česky	Původ - lokalita
<i>Erysiphe pisi</i>	<i>Pisum sativum</i> cv. Komet	hrách setý	Sbírka UPOC
<i>Golovinomyces cichoracearum</i> (syn. <i>Erysiphe cichoracearum</i> )	<i>Cucumis sativus</i> cv. Marketer	okurka setá	Sbírka UPOC
<i>Oidium neolycopersici</i> (rasa* CS2)	<i>Solanum esculentum</i> cv. Amateur	rajče jedlé	Sbírka UPOC

\* označení „rasa“ se používá pro rozlišení druhu daného patogena, který parazituje pouze na určité varietě hostitelské rostliny (Agrios, 2005)

## 3.2. Chemikálie

### 3.2.1. Enzymy a proteiny

- celulasa (EC 3.2.1.4) z *Aspergillus niger*, celulasa z *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- cytochrom c, insulin, koňský apomyoglobin - „ProteoMass™ Peptide & Protein MALDI-MS Calibration Kit“ (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- peptidové standardy pro MS – „Peptide Calibration Standard II“ (Bruker Daltonik, Bremen, Německo): bradykinin 1-7, angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, reninový substrát, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatin 28

### 3.2.2. Ostatní chemikálie

- aceton (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- acetonitril (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- 2-butanon (Merck, Darmstadt, Německo)
- dioxan (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- chloroform (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- matrice: kyselina kávová - CA (značka Fluka, dodavatel Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), kyselina ferulová - FA, kyselina sinapová - SA a norharman (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), kyselina dihydroxybenzoová - DHB a kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxykořicová - CHCA (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
- kyselina mravenčí (Acros Organics, Geel, Belgie)
- kyselina octová (Acros Organics, Geel, Belgie)
- kyselina trifluorooctová (Merck, Darmstadt, Germany)
- octan amonný (značka Fluka, dodavatel Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo)
- methanol (Biosolve B. v., Valkenswaard, Nizozemsko)
- ethanol (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

### 3.3. Materiál a přístrojová technika

- analytické váhy (Sartorius, Göttingen, Německo)
- centrifuga CL31R Multispeed (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- digitální předvážky (KERN, Balingen, Německo)
- magnetická míchačka (IKA, Staufen, Německo)
- MALDI terčik:
  - AnchorChip™ 600/96 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
  - FlexiMass-Disposable™ -TO430 (na bázi polymeru - „polymer-based“, PB)  
-TO483 (nerezová - „stainless steel“, SS)  
(Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, Velká Británie)
  - MSP 96 target ground steel (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
  - „MTP format (mikrotiračního formátu), SS - DE2115TA (Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, Velká Británie)
  - Opti-TOF™384 Well Insert, 123 x 81 mm (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
  - Sample Plate, SS, Numbers & Circles (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr:
  - AXIMA CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, Velká Británie)
  - Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo)
  - 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Carlsbad, CA, USA)
  - Voyager DE STR (Perseptive Biosystems, Carlsbad, CA, USA)
- mikrocentrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- nastavitelné pipety 5000, 1000, 200, 100, 20, 10 a 2,5 µL (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- světelný mikroskop Olympus BX-60 spojený s digitální kamerou Olympus DP70 (Olympus C& S, Praha, CZ)
- světelný mikroskop SMZ 800 spojený s digitální kamerou control unit DS-L1(Nikon GmbH, Německo)
- thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- vortex mixer SA8 (Stuart, Velká Británie)

### **3.4. Software**

Spektra měřená na hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 byla získána pomocí softwaru flexControl™ a zpracována v programu flexAnalysis™ (Bruker Daltonik). Ke konstrukci databáze a identifikaci fytopatogenů byl použit MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Software Shimadzu Biotech Launchpad™ (Kratos Analytical, Ltd.) sloužil k získávání a zpracovávání dat analyzovaných na přístroji Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical). K získávání dat u 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer byl využit software 4000 Series Explorer V3.5.28193, pro Voyager DE STR software Voyager Instrument Control Panel 5.10. K analýze sloužil program, Data Explorer 4.9 (Applied Biosystems), k porovnávání dat mMass verze 2.4 a 3.8 (Martin Strohal, Laboratoř Charakterizace molekulárních struktur, Mikrobiologický Ústav AVČR).

### **3.5. Použité metody**

#### **3.5.1. Pěstování rostlin a kultivace patogenů**

Pro optimalizaci metody získávání proteinových profilů intaktních spor fytopatogenů pomocí MALDI-TOF MS byla vybrána plíseň salátová, *Bremia lactucae* (rasa BL 16) ze sbírky UPOC (Národní program genetických zdrojů mikroorganismů ČR, KB PřF UP v Olomouci). Isolát byl udržován a množen na semenáčcích náchylného genotypu salátu *Lactuca sativa* cv. Cobham Green (Sedlářová *et al.*, 2001; Sedlářová *et al.*, 2007).

##### **3.5.1.1. Inokulace, udržování patogena a sběr vzorků**

Semenáčky náchylného genotypu salátu (*L. sativa* cv. Cobham Green) byly sprejovány suspenzí konidií *B. lactucae* v destilované vodě o hustotě přibližně  $5 \times 10^5$  /mL (hustota byla určena počítáním spor v Bürkerově komůrce). Inkubace probíhala ve fytotronu s dvanáctihodinovou fotoperiodou (15/10 °C; den/noc). Prvních 24 hodin však byly naočkované rostlinky uchovávány ve tmě pro navození optimálních podmínek k vývoji patogena. Po 7-10 dnech bylo připraveno nové inokulum (k přeočkování na nové semenáčky k udržování patogena), konidie byly smyty ze semenáčků do destilované vody a po mikroskopickém zhodnocení koncentrace bylo aplikováno na rostliny postřikem. Nebo byla takto připravená suspenze spor dále použita k analýze pomocí MS (Sedlářová *et al.*, 2007).

### **3.5.1.2. Pěstování semenáčků rostlin *Lactuca sativa* cv. Cobham Green**

Semena náchylného genotypu salátu (*L. sativa* cv. Cobham Green) byla vyseta do plastových misek na buničinu navlhčenou destilovanou vodou a inkubována ve fytotronu s dvanáctihodinovou fotoperiodou při teplotách 15 °C ve dne a 10 °C v noci. Po 4 dnech byly semenáčky zbaveny osemení a inokulovány postřikem suspenze spor o koncentraci cca 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> spor/mL (Sedlářová *et al.*, 2001; Sedlářová *et al.*, 2007).

### **3.5.1.3. Pěstování rostlin *Lactuca sativa* cv. Cobham Green**

Rostliny salátu byly vysety do zahradnického substrátu do květináčů (o průměru 9 cm) a kultivovány ve fytotronu (dvanáctihodinová fotoperioda při teplotách 18 °C ve dne a 15 °C v noci). Během pěstování byly dvakrát hnojeny (ve stáří 3. a 6. týdnů) hnojivem s obsahem dusíku formou závlivky (1 g/l): (11,9% nitratový dusík, 7,1% amoniakální dusík), fosforu (6 %), draslíku (20 %), hořčíku (3 %), boru (0,025 %), mědi (0,08 %), manganu (0,07 %), molybdenu (0,004 %) a zinku (0,043 %). Inokulace byla prováděna postřikem suspenze spor *B. lactucae* ve stáří 4, 5 a 6 týdnů na spodní strany listů. Inokulované rostliny byly uzavřeny do igelitových sáčků pro udržení vlhkosti a inkubovány 15/10 °C, 12/12, den/noc (Sedlářová *et al.*, 2001; Sedlářová *et al.*, 2007).

## **3.5.2. MALDI-TOF MS intaktních spor**

Byl vyvinut alternativní přístup identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS na základě analýzy intaktních buněk („intact cell“, ICMS) nebo spor („intact spore“, ISMS). Tato metoda je nenáročná na množství analyzovaného materiálu, využívá rychlého a relativně jednoduchého zpracování vzorku a interpretace dat. Je tedy velice vhodná k identifikaci a klasifikaci mikroorganismů (Fenselau & Demirev, 2001; Kemptner *et al.*, 2009a; Kemptner *et al.*, 2009b), zvláště pak fytopatogenů (peronospor a padlí), které parazitují na ekonomicky důležitých rostlinách a způsobují vážná onemocnění. Studium těchto obligátních biotrofních parazitů je ztíženo právě jejich způsobem parazitismu. Jsou závislé na svém hostiteli, a nelze je tudíž pěstovat sterilně na živném médiu (Agrios, 2005). Je třeba je vždy získat z živé hostitelské rostliny.

### **3.5.2.1. Příprava suspenze intaktních spor pro MALDI-TOF MS analýzu**

Spory studovaných fytopatogenů (peronospory a padlí) byly získávány přímo z listů (čerstvých nebo zamražených) napadených hostitelů omýváním nebo vytřepáváním do destilované vody. Vzniklá suspenze byla po odborné mikroskopické kontrole (pod vedením

doc. M. Sedlářové) třikrát promyta v destilované vodě - centrifugace při 5000 RCF („relative centrifugal force“) po dobu 3 min, poté odebrán supernatant a k sedimentu spor byla přidána čistá destilovaná voda. Počítáním v Bürkerově komůrce a dodatečným mikroskopickým zhodnocením byla suspenze zahuštěna na potřebnou koncentraci, a takto byla připravená pro přímé nanesení na MALDI destičku.

### **3.5.2.2. Optimalizace přípravy vzorku pro MALDI-TOF MS**

Optimalizační postupy pro MS analýzy biotyping byly prováděny na dvou modelových organismech - na plísní salátové, *Bremia lactucae* (rasa BL 16) a později, při přímém měření z listu, na padlí rajčat, *Oidium neolyopersici* (rasa CS2) ze sbírky UPOC.

Optimalizace přípravy vzorku zahrnuje volbu vhodné matrice, její koncentraci, vhodné složení rozpouštědla matrice a aditiv (např. acetonitril - ACN, kyselina trifluoroctová - TFA, ethanol - ETOH, methanol - MeOH, kyselina mravenčí, kyselina octová...), koncentrace spor v suspenzi, množství vzorku a roztoku matrice nanášené na MALDI destičku, technika nanášení vzorku s matricí na MALDI destičku, doba působení matrice na intaktní spory aj. (Fenselau & Demirev, 2001).

#### **Matrice, její koncentrace, množství nanášené na destičku**

Bylo vybráno 6 matric (SA, FA, CHCA, DHB, CA, norharman) o různých koncentracích (10, 20 a 30 mg/mL) rozpuštěných v roztoku (ACN) a 0.1% (v/v) kyseliny trifluoroctové v poměru 7:3 (v/v). Složení a poměr složek rozpouštědla (ACN:0.1%, v/v, TFA; 7:3, v/v) bylo zvoleno na základě práce Kemptner *et al.* (2009a), která se věnovala měření s plísněmi rodu *Fusarium*. Později byla 0.1% (v/v) TFA zaměněna za 2,5% (v/v) TFA (údaje o koncentraci použitých roztoků kyselin ve výsledkové části se vždy vztahují k objemovým procentům). Při počátečním měření byla koncentrace spor v suspenzi  $5 \times 10^8$  spor/mL, později byla taktéž optimalizována, a není-li uvedeno jinak, byla vždy pak používána koncentrace  $2-5 \times 10^9$  spor/mL. Vzorky a matrice byly na MALDI terčik (AnchorChip) nanášeny metodou vysušené kapky („dried-droplet“, Thomas *et al.*, 2004) o různých objemech (0.5, 0.6, 0.7, 0.8 a 1  $\mu$ L), viz tabulka 10a. Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3).

**Tab. 10a** Použité matrice, jejich koncentrace a rozpouštědla při optimalizaci MALDI-TOF MS intaktních spor

Název matrice	Koncentrace matrice (mg/mL)	Složení rozpouštědla	Poměr složek rozpouštědla (v/v)	Množství nanášené na terčik (μL)
kyselina sinapová (SA)	10, 20, 30*	ACN:0.1% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
		ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
kyselina ferulová (FA)	10, 20	ACN:0.1% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
		ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
kyselina α-kyano-4-hydroxybenzoesová (CHCA)	10, 20	ACN:0.1% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
		ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1
kyselina dihydroxybenzoesová (DHB)	10, 20	ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.7, 1
kyselina kávová (CA)	10, 20	ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.7, 1
norharman (9H-pyrido[3,4-b]indol)	10, 20	ACN:2,5% (v/v) TFA	7:3	0.7, 1

\* nejvyšší koncentrace SA (30 mg/mL) byla hodnocena později (viz kapitola 3.5.2.4)

### ***Kombinace poměru matric***

Další faktor, jenž by mohl ovlivnit kvalitu a reprodukovatelnost spekter proteinových profilů, je vliv vzájemného působení a kokrystalizace dvou matric.

Byly vybrány tři matrice CHCA, FA, SA (10 mg/mL), rozpouštěny v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v) a míseny v různých objemových poměrech - 1:1, 1:2, 1:3, 3:1 a 2:1 (v/v), tabulka 10b. Vzorky a matrice byly na MALDI terčik (AnchorChip) nanášeny metodou vysušené kapky (není-li uvedeno jinak, byly veškeré optimalizace prováděny nanášením touto preparační technikou - 1 μL suspenze spor, 1 μL roztoku matrice). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3). Poměry matric byly dále porovnávány i v prostředí ACN:0.1% TFA (7:3, v/v) o různých kombinacích FA:SA (roztoky 10 mg/mL FA a 10, 20 či 30 mg/mL SA byly směřovány v objemovém poměru 1:1, výsledkem jsou pak hmotnostní poměry matric 1:1, 1:2 a 1:3, w/w), tabulka 10c, a byly porovnávány se samotnou FA (10 mg/mL) a samotnou SA (30 mg/mL) v roztoku matrice. Tato spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3). Není-li uvedeno jinak, pro všechna spektra získávána z Axima CFR<sup>+</sup> hmotnostního spektrometru a analyzována v programu Launchpad (Shimadzu Biotech) byly upravovány parametry takto: šířka filtru

odečtení základní čáry („baseline subtraction - filter width“) byla nastavena na 500 a použita vyhlazovací metoda („smoothing method“) - Savitsky-Golay, šířka filtru: 5.

**Tab. 10b** Kombinace matic, jejich hmotnostní poměry, koncentrace a rozpouštědla použité pro optimalizaci analýzy MALDI-TOF MS

Kombinace matic	Poměr matic (v/v)*	Koncentrace matic*	Rozpouštědlo matic (v/v)
CHCA:FA	1:1	10 vs. 10 mg/mL	ACN:2,5% TFA (7:3)
	1:2		
	1:3		
	2:1		
	3:1		
CHCA:SA	1:1	10 vs. 10 mg/mL	ACN:2,5% TFA (7:3)
	1:2		
	1:3		
	2:1		
	3:1		
FA:SA	1:1	10 vs. 10 mg/mL	ACN:2,5% TFA (7:3)
	1:2		
	1:3		
	2:1		
	3:1		

\* informace o objemovém obsahu jednotlivých matic v pracovním roztoku, jak je uváděno ve výsledkové části se vždy vztahují k této tabulce

**Tab. 10c** Kombinace matic FA:SA, jejich hmotnostní poměry, koncentrace a rozpouštědla použité pro optimalizaci analýzy MALDI-TOF MS

Kombinace matic	Poměr matic (w/w)*	Koncentrace matic*	Rozpouštědlo matic (v/v)
FA:SA	1:1	10 vs. 10 mg /mL	ACN:0.1% TFA (7:3)
FA:SA	1:2	10 vs. 20 mg /mL	ACN:0.1% TFA (7:3)
FA:SA	1:3	10 vs. 30 mg /mL	ACN:0.1% TFA (7:3)

\* informace o hmotnostním obsahu jednotlivých matic v pracovním roztoku, jak je uváděno ve výsledkové části se vždy vztahují k této tabulce

### ***Vliv aditiv na zesílení signálů v proteinových profilech***

Za účelem dostatečného uvolnění proteinů z povrchů spor, zvýšení intenzity signálů, zvláště u vyšších hodnot  $m/z$ , a zlepšení kvality spekter byla použita různá organická rozpouštědla jako 10% přídavek k původnímu roztoku ACN:2:5% TFA (7:3, v/v). Níže jmenované matrice (Tab. 10d) byly tedy rozpuštěny v objemové směsi 9:1 roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v) a organického rozpouštědla či zředěného roztoku kyseliny. Vzorky a matrice byly nanášeny na MALDI terčik (AnchorChip). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3).



**Tab. 10d** Seznam aditiv a matric použitých pro optimalizaci analýzy MALDI-TOF MS

<b>Použité matrice (koncentrace 10 mg/mL)</b>	<b>Rozpouštědlo matrice (90%, v/v)</b>	<b>Aditivum (10%, v/v)</b>
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)		aceton
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)		butanon
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)	ACN:2,5% TFA	dioxan
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)	(7:3, v/v)	mravenčí kyselina
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)		octová kyselina
FA, SA, CHCA, FA:SA (1:1, v/v)		chloroform/methanol (2:1, v/v)

### 3.5.2.3. Porovnání výsledků na různých přístrojích

Pro použití biotypizace patogenů v praxi je stěžejní získávat reprodukovatelné profily, jež jsou pro daného zástupce specifické. Pro jednodušší a rychlou identifikaci by bylo výhodné, kdyby bylo možno získat na přístrojích jiných laboratoří a od jiných výrobců srovnatelné proteinové profily. Byla proto provedena porovnávací měření na čtyřech MALDI-TOF MS přístrojích (Tab. 11a): MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik), Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical), 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems) a Voyager DE STR (Perseptive Biosystems). Porovnání byla prováděna na patogenech *Bremia lactucae* (peronospora) a *Oidium neolycopersici* (padlí). Příprava vzorku a matrice byla prováděna ve všech případech stejně. Byly hodnoceny matrice FA, SA a FA:SA (1:1 a 1:3; w/w) v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v). Není-li uvedeno jinak, pro všechna spektra analyzována a porovnávána v programu mMass byly upravovány parametry takto: úprava základní čáry („baseline correction“): přesnost („precision“) – 100, relativní posun („relative offset“) – 0. Vyhlažování („smoothing“): Metoda – Savitsky-Golay, velikost okna („Windows size“) – 5 *m/z*, počet cyklů – 3.

**Tab. 11a** Seznam MALDI-TOF hmotnostních spektrometrů pro porovnání reprodukovatelnosti

Název přístroje/ • MALDI terčíky	Výrobce	Pracoviště
<b>Microflex LRF20/</b> • AnchorChip™ • MSP 96 target ground steel	Bruker Daltonik	Katedra Biochemie, Fakulta přírodovědecká, Univerzita Palackého v Olomouci
<b>Axima CFR<sup>+</sup>/</b> • FlexiMass-Disposable™ (TO430 a TO483) • MTP format (DE2115TA)	Shimadzu Biotech Kratos Analytical	Institut Chemické Technologie a analytiky, Fakulta technické chemie, Technická univerzita ve Vídni
<b>4800 MALDI TOF/TOF Analyzer/</b> • Opti-TOF™384 Well Insert	Applied Biosystems/ MDS SCIEX	Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové
<b>Voyager DE STR/</b> • Sample plate, SS, Numbers & Circles	Perseptive Biosystems	Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

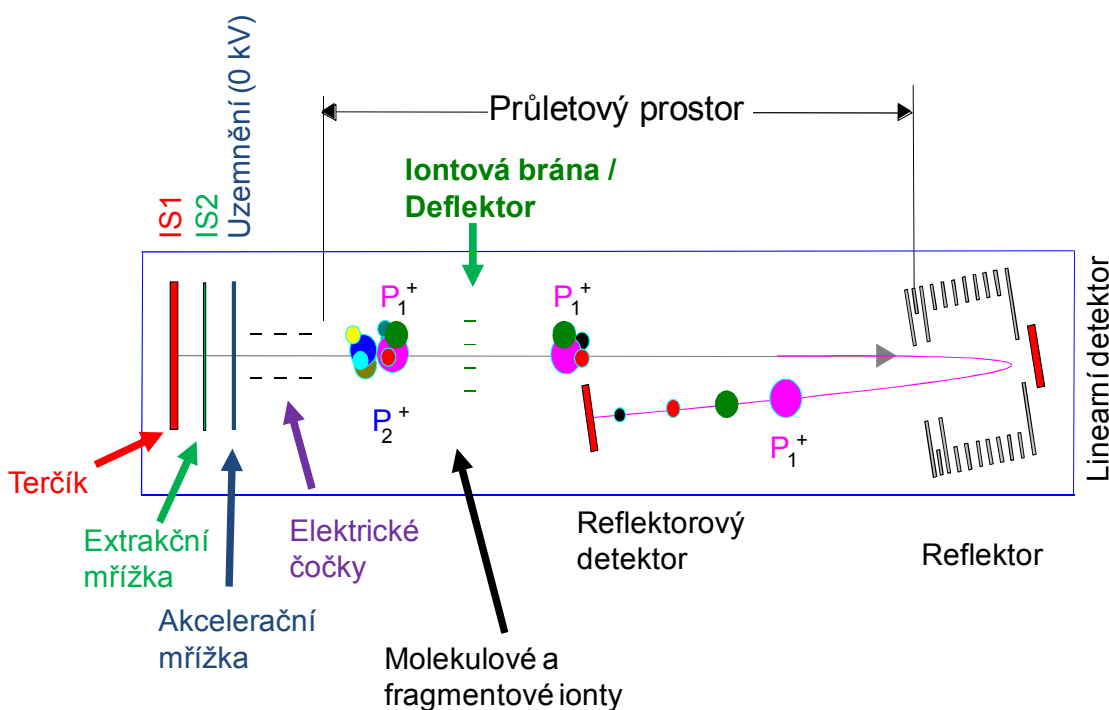
Spektra byla měřena na všech MALDI-TOF přístrojích v lineárním módu pro pozitivně nabitě ionty a externě kalibrována molekulovými ionty směsi peptidových standardů (Bruker Daltonik) na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonik), nebo molekulovými ionty insulinu, cytochromu c a apomyoglobinu (Sigma-Aldrich) na přístrojích Axima CFR<sup>+</sup> (Shimadzu Kratos Analytical), 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) a Voyager DE (Perseptive Biosystems). Parametry přístrojů jsou shrnuty v tabulce 11b.

**Tab. 11b** Nastavení, parametry přístrojů a softwaru pro získávání dat MALDI TOF a TOF/TOF použitých při analýzách intaktních spor

Název přístroje	Microflex LRF20 (Bruker Daltonik)	Axima CFR <sup>+</sup> (Shimadzu Biotech Kratos Analytical)	4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems/ MDS SCIEX)	Voyager DE STR (Perseptive Biosystems)
Parametry*				
Acquisition software	flexAnalysis	Launchpad Biotech	4000 Series Explorer V3.5.28193	Voyager Instrument Control Panel 5.10
Typ laseru (λ)	dusík (337 nm)	dusík (337 nm)	Nd:YAG (355 nm)	dusík (337 nm)
„acceleration voltage“	20.0 kV	20.0 kV	20.0 kV	25.0 kV
„extraction voltage“	18.6 kV	-	19.06 kV	23.25 kV
„lens voltage“	8.1 kV	6.0 kV	4.0 kV	-
„delayed extraction“	350 ns	8000 m/z	8000 m/z	320 ns

\*význam jednotlivých parametrů je vysvětlen níže

Urychlovací napětí („acceleration voltage“), IS1, vniká mezi kladně nebo záporně nabitým MALDI terčikem a uzemňující akcelerační elektrodou (Obr. 25). Je potřebné k urychlení vznikajících iontů do iontového zdroje. Extrakční napětí („extraction voltage“), IS2, vzniká při vložení elektrického potenciálu na extrakční mřížku a způsobí, že všechny nabitě částice se pohybují od MALD terčiku směrem k této elektrodě. V souvislosti s tímto napětím se využívá pulzní iontové extrakce - („pulsed /ion/ extraction“, P/I/E) neboli opožděné extrakce („delayed extraction“, DE), která umožňuje lépe zaostřit ionty se stejnou hmotností avšak jinou počáteční energií. Aplikuje-li se totiž tento potenciál na extrakční mřížku se zpožděním, ionty se stejnou hodnotou  $m/z$ , avšak odlišnou počáteční kinetickou energií, se budou pohybovat k detektoru různě rychle. Ty s vyšší energií budou blíže k extrakční mřížce, ale po aplikaci potenciálu na extrakční mřížku budou vystaveny nižšímu potenciálu a jejich pohyb se zpomalí, naopak ionty s nižší počáteční energií budou blíže k MALDI terčiku a v důsledku působení vyššího potenciálu budou rychlejší a během průletu trubící analyzátoru dojde k vyrovnání rychlostí těchto iontů. Parametry jsou voleny buď v nanosekundách (ns), což je čas zpoždění, nebo jako konkrétní hodnota  $m/z$ , v jejímž rozmezí je požadováno nejvyšší rozlišení. Napětí na elektrických čočkách („lens voltage“) umožňují zaostřit ionty stejného poměru  $m/z$  směřující k detektoru (Hoffman & Stroobant, 2007; Microflex™ User manual, 2008).



**Obr. 25** Schematické znázornění MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (převzato a upraveno z Microflex™ user manual, Version 1.2, Bruker Daltonik, 2008).

#### 3.5.2.4. Vliv koncentrace kyseliny trifluoroctové na buněčnou stěnu spor *B. lactucae*

Síla kyseliny může ovlivnit uvolnění proteinů z povrchu buněk a spor plísní nebo přímo jejich disrupci (Fenselau & Demirev, 2001). Pro sledování změn působení různých koncentrací TFA (0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%) na buněčnou stěnu spor *B. lactucae* (Tab. 12a, b) bylo využito jak hmotnostní spektrometrie, tak světelné mikroskopie.

#### Hmotnostní spektrometrie

Spory byly nanášeny na MALDI terčík - DE2115TA . Pro porovnání byly použity 3 matrice 10 mg/mL FA, 10 a 30 mg/mL SA a kombinace matric FA:SA (1:3, w/w). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3).

#### Světelná mikroskopie

Suspenze spor *B. lactucae* (2.5 µL) spolu s roztokem matrice (2.5 µL) byly nanášeny formou visuté kapky na krycí mikroskopické sklíčko. Pro porovnání byla použita kombinace matric FA:SA (1:3, w/w). Po 15 minutách (doba schnutí vzorku na destičce MALDI při laboratorní teplotě) byly spory pozorovány pod mikroskopem. Vliv roztoku matrice se zvyšující se koncentrací TFA (Tab. 12b) byl pozorován světelným mikroskopem Olympus BX-60 se zvětšením 200x a 400x a dokumentován digitální kamerou Olympus DP70.

**Tab. 12a** Složení roztoku matrice a koncentrační řada TFA použité pro MALDI TOF MS

Roztok matrice	Složení rozpouštědla	Použité matrice
1	ACN: 0.1% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA a SA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)
2	ACN: 0.3% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA a SA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)
3	ACN: 0.5% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)
4	ACN: 1.0% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)
5	ACN: 1.5% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)
6	ACN: 2.5% TFA (7:3, v/v)	10 mg/mL FA a SA, 30 mg/mL SA, FA:SA (1:3, w/w)

**Tab. 12b** Složení roztoku matrice FA:SA (1:3, w/w) pro mikroskopické pozorování

Roztok matrice	Složení rozpouštědla	Použité matrice
1	ACN: 0.1% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
2	ACN: 0.3% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
3	ACN: 0.5% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
4	ACN: 1.0% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
5	ACN: 1.5% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
6	ACN: 2.0% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)
7	ACN: 2.5% TFA (7:3, v/v)	FA:SA (1:3, w/w)

### 3.5.2.5. Volba MALDI destičky

Materiál, ze kterého je vyroben povrch MALDI destičky může ovlivnit krystalizaci matrice se vzorkem a tudíž i celou MS analýzu. Při analýze MALDI-TOF MS byly použity různé typy MALDI destiček (Obr. 26) - nerez („stainless steel“, SS) DE2115, na bázi polymeru („polymer-based“, PB) Fleximass TO430 a Fleximass TO483, SS (Shimadzu Kratos Analytical) Pro porovnání byly vzorky na destičky nanášeny technikou vysušené kapky. Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola 3.5.2.3).



**Obr. 26** MALDI destičky od firmy Shimadzu. MTP, SS, DE2115 (vlevo), Fleximass TO483, SS (uprostřed), Fleximass TO430, PB (vpravo)

([http://www2.shimadzu.com/applications/Life\\_Science/mo291\\_iss1.pdf](http://www2.shimadzu.com/applications/Life_Science/mo291_iss1.pdf);

[http://www.shimadzu-biotech.net/pages/products/1/fleximass\\_targets.php](http://www.shimadzu-biotech.net/pages/products/1/fleximass_targets.php);

[http://www.shimadzu.com.br/analitica/catalogos/biotech/37944\\_Fleximass\\_Leaflet\\_Final.pdf](http://www.shimadzu.com.br/analitica/catalogos/biotech/37944_Fleximass_Leaflet_Final.pdf)).

### 3.5.2.6. Techniky nanášení vzorku s matricí na MALDI destičku

Z hlediska co nejlepší kokrystalizace matrice se vzorkem a homogenity jejich krystalů byly vybrány tři techniky nanášení vzorku a matrice na MALDI destičku - technika vysušené kapky („dried droplet“, DD, Thomas *et al.*, 2004), smíšených objemů („mixed-volume“, V) a technika dvou vrstev („two-layer volume“, 2LV). Technika vysušené kapky spočívá v nanesení suspenze spor na MALDI destičku (1  $\mu$ L) a ta je následně převrstvena roztokem matrice (1  $\mu$ L) a ponechána volně zaschnout při laboratorní teplotě. Technika smíšených objemů představuje smíchání stejného poměru suspenze spor a roztoku matrice v mikrozkuhavce ještě před nanesením na MALDI destičku a 2  $\mu$ L takto připravené směsi jsou ponechány volně uschnout na MALDI destičce (Kemptner *et al.*, 2009b). Technika dvou vrstev je založena na podobném principu jako předešlá technika, liší se však v posledním kroku, kdy je na zaschnuté krystaly matrice se vzorkem ještě přidáno 1  $\mu$ L roztoku matrice (Dong *et al.*, 2009).

Pro porovnání krystalů a spekter byla použita matrice SA (30 mg/mL) a FA:SA (1:3, w/w) v roztoku ACN:0.1% TFA (7:3, v/v). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola; 3.5.2.3).

### **3.5.2.7. Vliv doby působení roztoku matrice na suspenzi spor**

Jako další faktor, který může ovlivnit tvorbu krystalů a uvolnění proteinů z povrchu spor je doba působení roztoku matrice na intaktní spory. Byly navrženy 3 různé doby s ve třech prostředích pro zaschnutí a kokrystalizaci matrice se vzorkem. Nejkratší doba byla zvolena pro vakuovou centrifugu, kde byla destička se vzorkem ihned po jeho nanesení vložena, a při evakuaci byl sledován čas, po který spoty se vzorky zaschly. Střední doba schnutí a tvorby krystalů představovala volnou evaporaci spotů při laboratorní teplotě. Nejdelší doba působení roztoku matrice na intaktní spory patogena představovala přípravu a zasychání vzorků v místnosti o teplotě 4 °C. Byly připravovány technikou vysušené kapky. Pro porovnání krystalů a spekter byla použita matrice SA (30 mg/mL) a FA:SA (1:3, w/w) v roztoku ACN:0.1% TFA (7:3, v/v). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola 3.5.2.3).

### **3.5.2.8. Použití celulas**

Jak je výše popsáno, zástupci peronospor, patřící do říše Chromista, mají buněčnou stěnu složenou převážně z celulózy, která dává buňkám a sporám patogenů pevnost a stabilitu (Welham *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Kalina & Váňa, 2005). Za účelem zlepšení a zesílení signálu MALDI-TOF proteinových profilů byly k narušení buněčné stěny spor *Bremia lactucae* vybrány dvě celulasy (z *Aspergillus niger* a *Trichoderma viride*, Sigma-Aldrich). Obě celulasy byly použity paralelně a za stejných podmínek upravených podle zavedených protokolů (Sigma-Aldrich, Worthington Enzyme Manual).

Byly připraveny roztoky celulas (1 mg/mL) v 50mM acetátu amonném (AmAc), pH 5.0 (pH optimum rozmezí 4-5.5 pro *T. viride* a 3.8-6 pro *A. niger*, [http://www.brenda-enzymes.info/php/result\\_flat.php4?ecno=3.2.1.4&Suchword=All+organisms&organism\[\]=&show\\_tm=0](http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4&Suchword=All+organisms&organism[]=&show_tm=0), Sigma-Aldrich, Worthington Enzyme Manual). K 50 µL suspenze spor (2-5 x 10<sup>9</sup> spor/mL) bylo přidáno 100 µL roztoku celulasy (jako kontrola byla použita čistá suspenze spor nanesená na destičku MALDI ještě před přidáním enzymu). Směs suspenze s roztokem celulasy byla za občasného míchání inkubována při 37 °C (Sigma-Aldrich, Worthington Enzyme Manual) po dobu 10, 30, 60, 90 a 120 minut. Vždy byl odebrán alikvot 30 µL, 3x promyt v destilované vodě a suspenze byla zahuštěna na 10 µL (cca 2-5 x 10<sup>9</sup> spor/mL). Na MALDI destičku technikou vysušené kapky byl nanášen 1 µL

suspenze s 1  $\mu$ L matrice SA (30 mg/mL) nebo FA:SA (1:3, w/w) v roztoku ACN:0.1% TFA (7:3, v/v). Jako blank byla použita destilovaná voda s roztokem celulasy. Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Axima CFR<sup>+</sup> (viz parametry přístroje kapitola 3.5.2.3).

### **3.5.3. Získání spekter ostatních studovaných fytopatogenů**

Měření s ostatními patogeny (viz tabulka 9a, b) bylo prováděno pomocí optimalizovaného protokolu. Byly používány vždy matrice 10 mg/mL FA, 10 mg/mL SA a 10 mg/mL CHCA v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v). Pro účely zahrnutí proteinových profilů patogenů do databáze byla spektra později proměřena s optimalizovanou kombinací matic FA:SA (10 mg/mL:30 mg/mL, 1:1, v/v neboli 1:3, w/w).

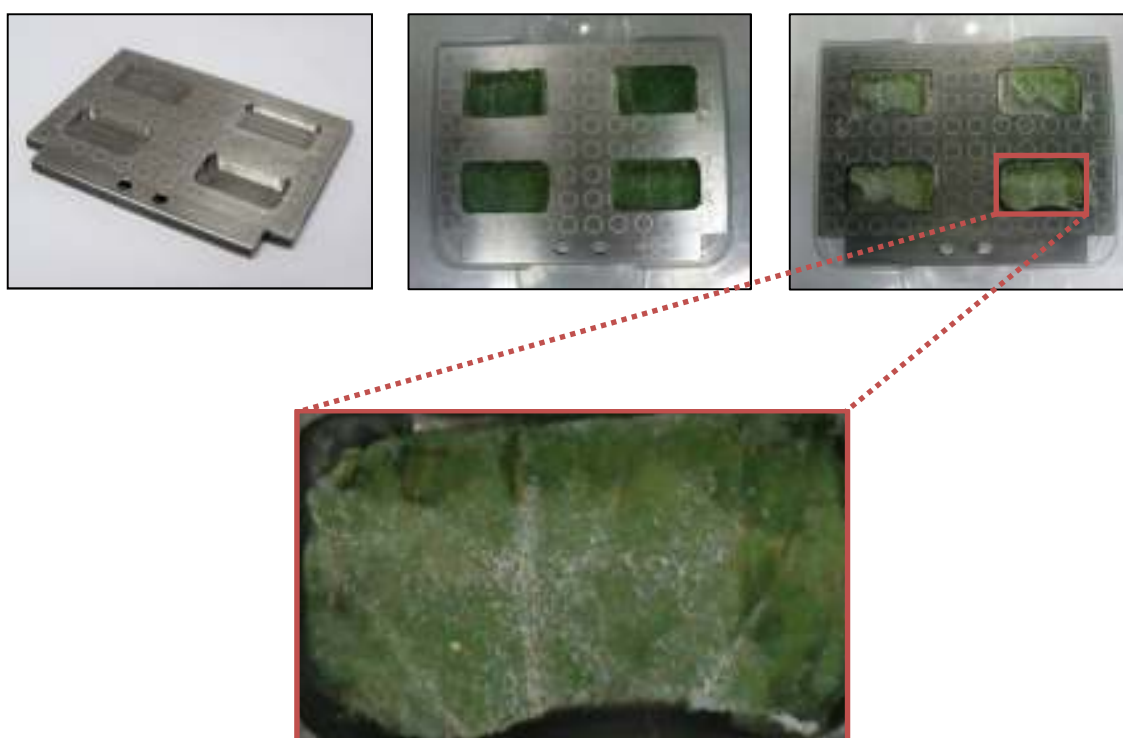
#### **3.5.3.1. Konstrukce databáze hmotnostních spekter pro biotyping**

Biotyping je charakterizace založená na biochemických vlastnostech např. isolátů plísní. Byla zkonstruována databáze 13 plísní (10 peronospor, 3 padlí), která by měla sloužit k identifikaci, porovnávání a charakterizaci isolátů z polních sběrů. Hmotnostní spektra peptidových a proteinových profilů byla načtena do databáze v programu MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik) a budou sloužit jako referenční spektra porovnáváním píků se spektry neznámými. V programu lze nastavit různé parametry, například tzv. vnitřní interval hmotnosti („Des. Mass Tolerance of the Adjusted Spectrum“) je přiřazen jako maximální bodové skóre a vnější interval hmotnosti („Furthermore Accepted MassTolerance of a Peak“) je přiřazen na základě vzdálenosti k vnitřnímu intervalu vzhledem k poměrnému počtu bodů relativně k maximu. Výsledná porovnání jsou barevně (zelená, žlutá, červená) a bodově rozlišena (skóre). Na kartě identifikace se také zobrazí grafické porovnání spekter.

### **3.5.4. Biotyping rostlinných patogenů přímo v biologickém materiálu**

Vývoj rutinní metody k identifikaci a biotypingu rostlinných patogenů přímo v biologickém materiálu (listy, povrch stonku aj.) by v budoucnu umožnil rychlou, levnou a spolehlivou diagnostiku. Byly provedeny první optimalizační a zkušební kroky k upevnění rostlinného materiálu pro bezproblémový vstup do hmotnostního spektrometru a zkušební měření na speciálně upravené standardní MALDI destičce. Pomocí frézování byla zakázkově ve Společné laboratoři optiky PřF UP a FÚ AVČR v Olomouci připravena MALDI destička s obdélnými jamkami o hloubce, 0.5, 1.0, 1.5 a 2.0 mm zvolenými pro různé tloušťky napadených listů (Obr. 27). Pro frézování byla použita jako výchozí materiál destička MSP96

target ground steel (Bruker Daltonik). List rajčete jedlého (*Solanum esculentum* cv. Amateur) se sporami padlí rajčat (*Oidium neolycopersici*) a lociky salátu (*Lactuca sativa* cv. Cobham Green) plísně salátové (*Bremia lactucae*) byl sestříhnut zhruba na velikost jamky na destičce (0.9 x 0.5 mm), připevněn transparentní oboustranně lepicí páskou. Poté byl celý list sprejován matricí (FA:SA, 1:3, w/w) v ACN:2.5% TFA (7:3, v/v) a uložen na několik hodin do exsikátoru pro důkladné vysušení. První měření s padlí rajčete (*Oidium neolycopersici*) probíhala bez kalibrace, další měření s plísní salátovou (*Bremia lactucae*) byla kalibrována tak, že po vysušení v exsikátoru byl do rohu listu nepipetováno 0.5 µL standardu a ten byl převrstven 0.5 µL roztoku matrice (technika vysušené kapky). Spektra byla měřena na MALDI-TOF Microflex LRF20 (viz parametry přístroje kapitola 3.5.2.3).



**Obr. 27** Speciálně upravená MALDI destička (MSP96 target ground steel, Bruker Daltonik). Před použitím (vlevo), po nalepení čerstvých listů rajčete s moučným povlakem konidioforů a mycelií patogena *Oidium neolycopersici* (uprostřed) a po vysušení v exsikátoru, s detailem listu (vpravo a dole).



## 6. Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout hmotnostně-spektrometrickou metodu pro rychlou a nenáročnou analýzu fytopatogenů, konstrukce databáze proteinových profilů studovaných rostlinných patogenů a závěrečným výsledkem mělo být vyvinutí rutinní metody k identifikaci a biotypingu rostlinných patogenů přímo v biologickém materiálu (listy, povrch stonku aj.), která by budoucnu umožnila rychlou, levnou a spolehlivou diagnostiku. Byly provedeny:

1. optimalizace přípravy vzorku pro identifikaci mikroorganismů (provedeny s *B. lactucae*)
  - koncentrace spor v suspenzi –  $2-5 \times 10^9$  spor/mL
  - složení optimalizovaného systému matric - 10 mg/mL FA a 30 mg/mL SA smíseny v objemovém poměru 1:1 (v/v) v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v)
2. optimalizace techniky přípravy vzorku
  - technika nanášení suspenze vzorku s matricí – vysušená kapka
  - množství nanášené suspenze vzorku a matrice na MALDI destičku – 1  $\mu$ L suspenze spor a 1  $\mu$ L vzorku se ponechá volně vypařit při laboratorní teplotě a normálním tlaku vzduchu
3. hodnocení spekter na základě:
  - měření na rozdílných přístrojích
  - použití různých typů MALDI destiček při měření
  - použití dvou celulas za účelem narušit buněčnou stěnu a získat intenzivnější signály proteinových profilů získaných hmotnostních spekter
4. konstrukce databáze proteinových profilů studovaných rostlinných patogenů získaných měřeními na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik), použitím systémů matric CHCA, FA a SA (10 mg/mL) později FA:SA (1:3, w/w) v roztoku ACN:2.5% TFA (7:3, v/v)
5. první zkušební analýza intaktních spor přímo z listu provedená s padlím *Oidium neolycopersici* parazitujícím na rajčeti jedlém (*Solanum esculentum*), druhá s peronosporou *Bremia lactucae* na listu salátu (*Lactuca sativa*)
  - signály specifických proteinů byly identifikovatelné měřením provedeným laserovou desorpcí přímo z napadeného listu, do budoucna je v plánu optimalizovat, sjednotit a usnadnit veškeré kroky spojené s přípravou listu či stonku k měření.

Tato práce umožnila otevřít nový pohled v diagnostice fytopatogenů, zvláště pak obligátních biotrofních parazitů jako jsou peronospory a padlí. Lze předpokládat, že by v budoucnu tento přístup, založený na hmotnostně-spektrometrických analýzách, mohl nahradit anebo alespoň doplnit současné metody diagnostiky.

## Seznam použité literatury

- Agrios G. N. (2005) Plant pathology, 5<sup>th</sup> edition , pp. 77-100, 388-404, 409-433, 439-451, Elsevier Academic Press, Oxford.
- Amey R. C., Schleicher T., Slinn J., Lewis M., Macdonald M., Neill J. S., Spencer-Phillips P. T. N. (2008) Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **122**, 41–55.
- Amiri-Eliasi B., Fenselau C. (2001) Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal. Chem.* **73**, 5228-5231.
- Anhalt J. P., Fenselau C. (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **47**, 219-225.
- Arnold R. J., Reilly J. P. (1998) Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 630-636.
- Bélanger R. R., Jarvis W. R. (1994) Occurrence of powdery mildew (*Erysiphe* sp.) on greenhouse tomatoes. *Canada. Plant Dis.* **78**, 640.
- Bhadauria V., Banniza S., Wang L. - X., Wei Y., Peng Y. - L. (2010) Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* **126**, 81-95.
- Bhadauria V., Banniza S., Wei Y., Peng Y. -L. (2009) Reverse genetics for functional genomics of phytopathogenic fungi and oomycetes. *Comp. Funct. Genomics* **2009**, 1-11.
- Bhattacharya, D., Medlin, L. (1995) The phylogeny of plastids based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**, 489-498.
- Birmingham J., Demirev P., Ho Y. - P., Thomas J., Bryden W., Fenselau C. (1999) Corona plasma discharge for rapid analysis of microorganisms by mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **13**, 604-606.
- Boiteux L. S. (1994) Powdery mildew of potato caused by *Erysiphe cichoracearum*. *Brazil. Plant Dis.* **78**, 830.
- Bothner B., Dong X. F., Bibbs L., Johnson J. E., Siuzdak G. (1998) Evidence of viral capsid dynamics using limited proteolysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **273**, 673-676.
- Bothner B., Siuzdak S. (2004) Electrospray Ionization of a Whole Virus: Analyzing Mass, Structure, and Viability. *ChemBioChem* **5**, 258-260.
- Bowman K. D., Albrecht U., Grahan J. H., Bright D. B. (2007) Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora* in citrus rous using PCR-RFLP in comparison with other methods. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 143-158.
- Braun U. (1987) A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Nova Hedwig. Beih.* **89**, 1-700.

- Braun U. (1995) The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe, G. Fischer Verlag, Jena, pp. 337.
- Braun U., Cook R. T. A., Inman A. J., Shin H. - D. (2002) The taxonomy of the powdery mildews. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise* (Bélanger, ed.), pp. 13-55, APS Press, USA.
- Bruker Daltonics, Microflex User manual, Version 1.2 (2008) pp. 17-24, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo.
- Cain T. C., Lubman D. M., Webber W. J. (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from MALDI-TOF-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1026-1030.
- Carlile M. J., Gooday G. W., Watkinson S. C. (2001) The Fungi, 2<sup>nd</sup> edition, pp. 11-14, Academic Press Ltd. San Diego, CA.
- Cavalier-Smith T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* **73**, 203-266.
- Cavalier-Smith T. (2004) Only six kingdoms of life. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**, 1251-1262.
- Claydon M. A., Davey S. N., Edwards Jones V., Gordon D. B. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1584-1586.
- Cook R. T. A., Inman A. J., Billings C. (1997) Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host data. *Mycol. Res.* **101**, 975-1002.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G., Brasier C. M. (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal. Gen. Biol.* **30**, 17-32.
- Čača Z., Kollár V., Novák J. B., Zvára J. (1981) Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 344 p.
- Demirev P. A., Ho Y. - P., Ryzhov V., Fenselau C. (1999) Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal. Chem.* **71**, 2732-2738.
- Demirev P. A., Lin J. S., Pineda F. J., Fenselau C. (2001) Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Anal. Chem.* **73**, 4566-4573.
- Despeyroux P. A., Phillpotts R., Watts P. (1996) Electrospray mass spectrometry for detection and characterization of purified cricket paralysis virus (CrPV). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, 937-941.
- Dick M. W. (1995) Sexual reproduction in the Peronosporomycetes (chromistan fungi). *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1), 712-724.
- Dick M. W. (2001) Straminipilous fungi. systematics of the peronosporomycetes, including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids, and similar organisms, pp. 78-87, 125-150, Springer, Wien, Austria.

Dick M. W., Vick M. C., Gibbings J. G., Hedderson T. A., Lopez Lastra, C. C. (1999) 18S rDNA for species of *Leptolegnia* and other *Peronosporomycetes*: justification for the subclass taxa *Saprolegniomycetidae* and *Peronosporomycetidae* and division of the *Saprolegniaceae sensu lato* into the *Leptolegniaceae* and *Saprolegniaceae*. *Mycol. Res.* **103**, 1119-1125.

Dixon G. R (1978) Powdery mildews of vegetable and allied crops. In *Powdery mildews* (Spencer, ed.), pp. 495–524, Academic Press, London.

Dong H., Kemptner J., Marchetti-Deschmann M., Kubicek Ch. P., Allmaier G. (2009) Development of a MALDI two-layer volume sample preparation technique for analysis of colored conidia spores of *Fusarium* by MALDI linear TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1373-83.

Easterling M. L., Colangelo C. M., Scott R. A., Amster I. J. (1998) Monitoring protein expression in whole bacterial cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **70**, 2704-2709.

Erper I., Karaca G. H., Türkkän M. (2010) First report of *Phyllactinia fraxini* causing powdery mildew on ash in Turkey. *New Disease Reports* **20**, 39.

Evason D. J., Caydon M. A., Gordon D. B. (2000) Effects of ion mode and matrix additives in the identification of bacteria by intact cell mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 669-672.

Evason D. J., Caydon M. A., Gordon D. B. (2001) Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 49-54.

Fenselau C., Demirev P. A. (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 157-171.

Forster H, Coffey M. D., Elwood H., Sogin M. L. (1990). Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoospore fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**, 306-312.

Fox A., Rogers J. G., Fox K. F., Schnitzer G., Morgan S. L., Brown A., Aono R. (1990) Chemotaxonomic differentiation of Legionellae by detection and characterization of aminodideoxyhexoses and other unique sugars using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 546-552.

Fox A., Black G. E., Fox K., Rostovtseva S. (1993) Determination of carbohydrate profiles of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* including identification of O-methyl methylpentoses by using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 887-894.

Gil F., Gay J. L. (1977) Ultrastructural and physiological properties of the host interfacial components of haustoria of *Erysiphe pisi* *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* **10**, 1-10.

Goodacre R., Heald J. K., Kell D. B. (1999) Characterization of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 17-24.

Hall G. S. (1996) Modern approaches to species concept in downy mildews. *Plant Pathol.* **45**, 1009-1026.

Hathout Y., Demirev P. A., Ho YP, Bundy J. L., Ryzhov V., Sapp L., Stutler J., Jackman J., Fenselau C. (1999) Identification of *Bacillus* spores by matrix-assisted laser desorption ionization- mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4313-4319.

Heller D. N., Cotter R. J., Fenselau C., Uy O. M. (1987a) Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59**, 2806-2809.

Heller D. N., Fenselau C., Cotter C. J., Demirev P., Olthoff J. K., Honovich J., Uy M., Tanaka T., Kishimoto Y. (1987b) Mass spectral analysis of complex lipids desorbed directly from lyophilized membranes and cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 194-9.

Hibbit D. S., Pine E. M., Langer E., Langer G., Donoghue M. (1997) Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12002-12006.

Hiura U. (1978) Genetic basis of formae speciales in *Erysiphe graminis* DC. In *The Powdery Mildews* (Spencer, ed.), pp. 101-128, Academic Press, London.

Ho Y. P., Fenselau C. (1998) Applications of 1.06-micron IR laser desorption on a Fourier transform mass spectrometer. *Anal. Chem.* **70**, 4890-4895.

Hoffmann E., Stroobant V. (2007) *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Third Edition, pp. 123-131 John Wiley, Chichester, England.

Holland R. D., Wilkes J. G., Rafii F., Sutherland J. B., Persons C. C., Voorhees K. J., Lay J. O. (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1227-1232.

Hudspeth D. S. S., Nadler S. A., Hudspeth M. E. S. (2000) A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* **92**, 674-684.

Chen H. -Y., Chen Y. - CH. (2005) Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3564-3568.

Choi Y. - J., Hong S. -B., Shin H. - D. (2005) A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data, *Mycol. Res.* **109**, 841-848.

Christian N. P., Arnold R. J., Reilly J. P. (2000) Improved calibration of time-of-flight mass spectra by simplex optimization of electrostatic ion calculations. *Anal. Chem.* **72**, 3327-3337.

Iwata Y. (1942) Specialization of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov. II. Comparative studies of the morphologies of the fungi from *Cucumis sativus* L. and *Cucurbita moschata* Duchesne. *Ann. Phytopathol. Soc. of Japan* **11**, 172-185.

Jahn M., Munger H. M., McCreight J. D. (2002) Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise* (Bélanger, ed.), pp. 239-248, APS Press, USA.

Jones H. E., Whipps J. M., Thomas B. J., Carver T. L. W., Gurr S. J. (2000) Initial events in the colonization of tomatoes by *Oidium lycopersici*, a distinct powdery mildew fungus of *Lycopersicon* species. *Can. J. Bot.* **78**, 1361-1366.

Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, pp. 48-50, 129-147, 229-236, 309-312. Nakladatelství Karolinum, Praha.

Karty J. A., Lato S., Reilly J. P. (1998) Detection of the bacteriological sex factor in *E. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 625-629.

Kavanagh K. (2005) *Fungi - Proteomics and application*, pp. 219-223, John Wiley, Chichester, England.

Kemptner J., Marchetti-Deschmann M., Kubicek CH. P., Allmaier G. (2009b) Mixed volume sample preparation method for intact cell mass spectrometry of *Fusarium* spores. *J. Mass Spectrom.* **44**, 1622-1624.

Kemptner J., Marchetti-Deschmann M., Mach R., Druzhinia I. S., Kubicek CH. P., Allmaier G. (2009a) Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 877- 884.

Kim Y. J., Freas A., Fenselau C. (2001) Analysis of viral glycoproteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 1544-1548.

Kiss L., Cook R.T.A., Saenz G. S., Cunnington J. H., Takamatsu S., Pascoe I., Bardin, M., Nicot P. C., Sato Y., Rossman A. Y. (2001) Identification of two powdery mildew, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *Oidium lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycol. Res.* **105**, 684–697.

Koike S. T., Saenz G. S. (1999) Powdery mildew of spearmint caused by *Erysiphe orontii*. *California. Plant Dis.* **8**, 399.

Krishnamurthy T., Rajamani U., Ross P. L., Eng J., Davis M., Lee T. D., Stahl D. S., Yates J. (2000a) Bacterial typing and identification by mass spectrometry. In: *Natural and selected synthetic toxins. ACS Symp. Series* **745**, 67- 97.

Krishnamurthy T., Ross P. L., Ramajani U. (1996) Detection of pathogenic and nonpathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 883-888.

Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989) *Obecná fytopatologie*, pp. 14-62, Academia, Praha.

Lebeda A., Hübschová, J., Urban, J. (2010): Temporal population dynamics of *Pseudoperonospora cubensis*. In *Cucurbitaceae 2010 Proceedings*, (Thies, ed.), pp. 240-243. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, USA.

Lebeda A., Petrželová I. (2004a) Variation and distribution of virulence phenotypes of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *Plant Pathol.* **53**, 316–324.

Lebeda A., Petrželová I. (2004b) Occurrence of race-specific resistance to *Bremia lactucae* in *Lactuca serriola* germplasm originating from four European countries. Genetic variation for plant breeding, pp. 113–116, EUCARPIA & BOKU-University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria.

Lebeda A., Petrželová I., Maryška Z. (2008a) Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola-Bremia lactucae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **122**, 127–146.

Lebeda A., Pink D. A. C., Astley D. (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In *Advances in downy mildew research* (Spencer-Phillips, ed.), pp. 85–117, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Dordrecht.

Lebeda A., Sedlářová M., Petřivalský M., Prokopová J. (2008b) Diversity of defence mechanisms in plantoomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp.- *Bremia lactucae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **22**, 71-89.

Lebeda A., Spencer-Phillips P. T. N., Cooke B. M. (2008) *The Downy Mildews - Genetics, Molecular Biology and Control*, pp. 89, Springer, Wien, Austria.

Lebeda A., Syrovátka P. (1988) Specificity of *Bremia lactucae* isolates from *Lactuca sativa* and some Asteraceae plants. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* **23**, 39–48.

Leipe D. D., Tong S. M., Goggin C. L., Slemenda S. B., Pienjazek N. J., Sogin M. L. (1996) 16S-like rDNA sequences from *Developayella elegans*, *Lallyrinthuloides haliotidis*, and *Proteromonas lacertae* confirm that the stramenopiles are a primarily heterotrophic group. *Eur. J. Protistol.* **32**, 449-458.

Léveillé J. H. (1851) Organisation et disposition méthodique des espèces qui composent le genre Erysiphé. *Anna. Sci. Nat. Bot., Séries 3*, **15**, 109-179.

Li T. - Z., Liu B. - H., Chen Y. - CH. (2000) Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2393-2400.

Lieber D. C. (2002) *Introduction to proteomics. Tools for the new biology*, pp. 9, 55-76, Humana Press, Totowa, NJ, USA.

Liu H., Du Z., Wang J., Yang R. (2007) A universal sample preparation method for characterization of bacteria by MALDI-TOF MS. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1899–1907.

Lynn E. C., Chung M. C., Tsai W. C., Han C. C. (1999) Identification of *Enterobacteriaceae* bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **13**, 2022-2027.

Madonna A. J., Basile F., Ferrer I., Meetani M. A., Rees J. C., Voorhees K. J. (2000) On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 22201-2229.

Magnuson M. L., Owens J. H., Kelty C. A. (2000) Characterization of *Cryptosporidium parvum* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**,4720-4724.

Marshall A. G., Hendrickson C. L. Shi S.D.H. (2002) Scaling MS plateaus with high-resolution FT-ICRMS. *Anal. Chem.*, **74** (9), 253A–259A *Anal. Chem.* **74**, 253–9.

Matsumoto C., Kageyama K., Suga H., Hyakumachi M. (1999) Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5, 8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* **40**, 321–331.

McCartney H. A., Foster S. J., Fraaije B. A., Ward E. (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Manag.Sci.* **59**, 129-142.

Mehrotra R., Aggarwal A., (2003) Plant Pathology, second edition, pp. 339-385, Tata McGraw-Hill Education, New Delhi, India.

Mieslerová B., Lebeda, A. (1999) Taxonomy, distribution and biology of the tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*). *J. Plant Dis. Prot.* **106**, 140–157.

Mori Y., Sato Y., Takamatsu S. (2000) Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi (Erysiphales) using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* **92**, 74-93.

Národní program genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu Databáze NPGZM: <http://www.vurv.cz/collections/vurv.exe/search?lang=cz>

Nilsson C. L. (1999) Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1067-1071.

Noir S., Colby T., Harzen A., Schmidt J., Ranstruga R. (2009) A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) conidiospores. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 223–236.

Pandey A., Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-846.

Petersen A. B., Rosendahl S. (2000) Phylogeny of the Peronosporomycetes (Oomycota) based on partial sequences of the large ribosomal subunit (LSU rDNA). *Mycol. Res.* **104**, 1295-1303.

Phinney B. S., Blackburn K., Brown D. T. (2000) The surface conformation of Sindbis virus glycoproteins E1 and E2 at neutral and low pH, as determined by mass spectrometry based mapping. *J. Virol.* **74**, 5667-5678.

Pineda F. J., Lin J. S., Fenselau C., Demirev P. A. (2000) Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search. *Anal. Chem.* **72**, 3739-3744.

Poulter R., Harvey L., Burritt D. (2003) Qualitative resistance to powdery mildew in hybrid sweet peas. *Euphytica* **133**, 349-358.

Ramirez J., Fenselau C. (2001) Factors contributing to peak broadening and mass accuracy in the characterization of intact spores using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 929-936.

Reinganum C., O'Loughlin G. T. and Hogan T. W. (1970) A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae) *J. Invert. Pathol.* **16**, 214-220.

Riethmüller A., Voglmayr H., Göker M., Weiß M., Oberwinkler F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (*Peronosporales*) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **94**, 834–849.

Riethmüller A., Weiß M., Oberwinkler F. (1999) Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit DNA sequences. *Can. J. Bot.* **77**, 1790-1800.



Ryzhov V., Bundy J. L., Fenselau C., Taranenko N., Doroshenko V., Prasad C. R. (2000a) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight analysis of *Bacillus* spores using a 2.94  $\mu\text{m}$  infrared laser. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1701-1706.

Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. (2000b) Rapid characterization of spores *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3828-3834.

Saenz G. S., Taylor J. W. (1999a) Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* **77**, 150-168.

Saenz G. S., Taylor J. W. (1999b) Phylogenetic relationships of *Meliola* and *Meliolina* inferred from small subunit rRNA sequences. *Mycol. Res.* **103**, 1049-1056.

Sedláková B., Lebeda A. (2010) Temporal population dynamics of cucurbit powdery mildews (*Golovinomyces cichoracearum* and *Podosphaera xanthii*) in the Czech Republic. In *Cucurbitaceae 2010 Proceedings* (Thies, ed.), pp. 244-247. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, USA.

Sedlár J., Sedlářová M., Flusser, J. (2009) Image Processing Methods for Determination of Downy Mildews from Light Microscopy Images. In: Signal Processing Symposium, 28.-30.5.2009, Warsaw, Poland, 4 pp.

Sedlářová M., Luhová L., Petřivalský M., Lebeda, A. (2007). Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 607–616.

Sedlářová M., Lebeda A., Pink D. A. C. (2001). The early stages of interaction between effective and non-effective race-specific genes in *Lactuca sativa*, wild *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae* (race NL16). *J. Plant Dis. Prot.*, **108**, 477–489.

Sedlářová M., Stojaspal K., Lebeda A. (2010) Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České republice. *Rostlinolékař* **21**, 17-20.

Sedlářová M., Vinter V. (2007) Rostlinná pletiva pod vlivem houbových chorob. *Živa* **55**, 250-253.

Shin H. D., Choi Y. J. (2003) A first check-list of Peronosporaceae from Korea. *Mycotaxon* **86**, 249–267.

Scholl P. F., Leonardo M. A., Rule A. M., Carlson M. A., Antoine M. D., Buckley T. J. (1999) The development of matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of biological warfare agent aerosols. *J. Hopkins APL Technol. Digest* **20**, 343-351.

Simpson A. G. B., Roger A. J. (2002) Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Curr. Biol.* **12**, 691–693.

Siuzdak G., Bothner B., Yeager M., Brugidou C., Fauquet C. M., Hoey K., Chang C. M. (1996) Mass spectrometry and viral analysis. *Chem. Biol.* **3**, 45-48.

Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Phillips, D. H. Archer, S. A., eds. (1988) European Handbook of Plant Diseases. pp. 199-249, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Sulc M., Peslova K., Zabka M., Hajduch M., Havlicek V. (2009) Biomarkers of *Aspergillus* spores: Strain typing and protein identification. *Int. J. Mass Spectrom.* **280**, 162-168.
- Takamatsu S., Hirata T., Sato Y., Nomura Y. (1999) Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* sect. *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. *Mycoscience* **40**, 259-268.
- Takamatsu S., Hirata T., Sato Y. (1998) Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience* **39**, 441-453.
- Takamatsu S., Hirata T., Sato Y. (2000) A parasitic transition from trees to herbs occurred at least two times in tribus Cystothecae (Erysiphaceae): Evidence from nuclear ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **104**, 1304-1311.
- Taylor J. W. (1993) A contemporary view of the holomorph. Nucleic acid sequences and computer databases and changing fungal classification. In *The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (Reynolds D. R. & Taylor J. W.), pp. 3-15. CAB International, Wallingford.
- Thines B. M. (2002) Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 137-167.
- Thomas H., Havliš J., Peychl J., Shevchenko A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChip<sup>TM</sup> targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 923.
- Thomas J. J., Falk B., Fenselau C., Jackmann J., Ezzel J. (1998) Viral characterization by direct analysis of capsid proteins. *Anal. Chem.* **70**, 3863-3867.
- To-anum CH., Kom-un S., Sunawan A., Fangfuk W., Sato Y., Takamatsu S. (2005) A new subgenus, *Microidium* of *Oidium* (Erysiphaceae) on *Phyllanthus* spp. *Mycoscience* **46**, 1-8.
- Ullom J. N., Frank M., Gard E. E., Horn J. M., Labov S. E., Langry K., Magnotta F., Stanion K. A., Hack C. A., Benner W. H. (2001) Discrimination between bacterial spore types using time-of-flight mass spectrometry and matrix free infrared laser desorption and ionization. *Anal. Chem.* **73**, 2331-2337.
- Urban Z., Kalina T. (1980) Systém a evoluce nižších rostlin, 1. vyd., pp. 415, SPN Praha, CZ
- Vaidyanathan S., Rowland J. J., Kell D. B., Goodacre R. (2001) Discrimination of aerobic endospore-forming bacteria via electrospray-ionization mass spectrometry of whole cell suspension. *Anal. Chem.* **73**, 4134-4144.
- Valentine N. B., Wahl J. H., Kingsley M. T., Wahl K. L. (2002) Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1352-1357.

- Van de Peer Y., Van der Auwera G., De Wachter R. (1996). The evolution of stramenopiles and alveolates as derived by "substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Evol.* **42**, 201-210.
- Van der Auwera G., De Baere R., Van de Peer Y., De Rijk P., Van den Broeck I., De Wachter R. (1995). The phylogeny of the Hyphochytriomycota as deduced from ribosomal RNA sequences of *Hyphochytrium catenoides*. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 671-678.
- Wang Z., Russon L., Li L., Roser D. C., Long S. R. (1998) Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 456-464.
- Waterhouse G. M., Brothers, M. P. (1981) The taxonomy of *Pseudoperonospora*. *Mycol. Pap.* **148**, 1-18.
- Weber R. W. S., Webster J. (2001) Teaching techniques for mycology: 13. Functioning of cleistothecia in *Phyllactinia guttata*. *Mycologist* **15**, 26-30.
- Webster J., Weber R. W. S. (2007) Introduction to fungi, 3<sup>rd</sup> edition, pp. 115-125, Cambridge University press, New York.
- Welham K. J., Domin M. A., Johnson K., Jones L., Ashton D. S. (2000) Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 307-310.
- Welham K. J., Domin M. A., Scanell D. E., Cohen E., Ashton D. S. (1998) The characterization of micro-organisms by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spectrom.* **12**, 176-180.
- Winkler M. A., Uher J., Cepa S. (1999) Direct analysis and identification of *Helicobacter* and *Campylobacter* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71**, 3416-3419.
- Worthington, C. E. (1988) *Worthington Enzyme Manual*, pp. 76-79, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ
- Xiang F., Anderson G. A., Veenstra T. D., Lipton M. S., Smith R. D. (2000) Characterization of microorganisms and biomarker development from global ESI-MS/MS analyses of cell lysates. *Anal. Chem.* **72**, 2475-2481.
- Y. - J. Choi, Denchev C. M., H. – D. Shin (2008) Morphological and Molecular Analyses Support the Existence of Host-specific Peronospora Species Infecting *Chenopodium*. *Mycopathologia* **165**, 155-164.
- Yao X., Freas A., Ramirez J., Demirev P. A., Fenselau C. (2001) Proteolytic O-18 labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal. Chem.* **73**, 2836-2842.

## Seznam použitých zkratek

2LV	technika dvou vrstev („two-layer volume“)
ACN	acetonitril
AmAc	octan amonný („amonium acetate“)
CA	kyselina kávová („caffeic acid“)
CID	kolizní cela („collision induced dissociation“)
COII	podjednotka 2 cytochrom c oxidasy
COX2	cytochrom c oxidasa 2
CrPV	„cricket paralysis virus“ - poprvé objeven u australských cvrčků (z angl. „cricket“ - cvrček).
Da	Dalton
DD	technika vysušené kapky („dried droplet“)
DE, P(I)E	opožděná extrakce („delayed extraction“), pulzní (iontová) extrakce („pulsed ion extraction“)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
ETOH	ethanol
FA	kyselina ferulová
FAB	ionizace nárazem rychlých atomů („fast atom bombardement“)
f. sp.	speciální formy („ <i>formae speciales</i> “)
CHCA	$\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina („ $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid“)
ICMS, ISMS	hmotnostní spektrometrie intaktních buněk nebo spor („intact cel/spore mass spectrometry“)
IT	iontová past („ion trap“)
ITS	„internal transcribed spacer“ - vnitřní transkribovaný mezerník
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti (1 kDa = 1000 D, Daltonů)
LC	kapalinová chromatografie („liquid chromatography“)
LDI	desorpce pomocí laseru („laser/desorption ionization“)
LP	síla laseru („laser power“)
LSU rRNA	velká podjednotka rRNA („large subunit rRNA“)
MALDI	laserová ionizace a desorpce za účasti matrice („matrix-assisted laser
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
mtDNA	mitochondriální DNA (),
Mze ČR	Ministerstvo zemědělství České republiky
Nd-YAG	neodym-yttrium aluminium granát ( $Y_3Al_5O_{12}$ )
NPGZM	Národní program genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu
PB	materiál na bázi polymeru („polymer-based“)
PCR	polymerázové řetězové reakce („polymerase chain reaction“).
PD	desorpce pomocí plasmu („plasma desorption“)
PMF	peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“)
RCF	relativní centrifugační síla („relative centrifugal force“)
rDNA	ribozomální DNA
rRNA	ribozomální RNA
SA	kyselina sinapová („sinapic acid“)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SEM	skenovací elektronové mikroskopie
SS	nerez („stainless steel“)
SSU rRNA	malá podjednotka rRNA („small subunit rRNA“)
TFA	trifluoroctová kyselina (trifluoroacetic acid“)
TOF	analyzátor doby letu („time of flight“)
V	technika smíšených objemů („mixed-volume technic“)