

Přírodovědecká fakulta Jihočeské
univerzity v Českých Budějovicích

Bakalářská práce

Detekce a identifikace fytoplazem ve
šlechtitelském materiálu hrušní

Helena Čermáková
2009

Vedoucí práce: Ing. Jana Fránová, Dr.

Bakalářská práce

Čermáková, H., 2009: Detekce a identifikace fytoplazem ve šlechtitelském materiálu hrušni. [Detection and identification of phytoplasmas infecting pear trees. Bachelor Thesis, in Czech]- 40 p., Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Phytoplasmas are bacterial intracellular plant pathogens that can cause devastating yield losses in diverse crops worldwide. Phytoplasmas were detected using molecular methods in pear trees. RFLP analysis revealed the presence of pear decline, apple proliferation, clover phyllody and stolbur phytoplasmas in examined samples singly or in mixed infection.

Tato práce byla financována prostředky z grantů GA AV ČR 1QS500510558, MŠMT OC09021 a z příspěvku Katedry genetiky PřF JU.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím citované literatury a rad školitelky.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 21.4.2009

.....

Helena Čermáková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Ing. Janě Fránové, Dr. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost, dále pak kolektivu laboratoře Rostlinné virologie za ochotnou pomoc a v neposlední řadě také celé mé rodině a blízkým, kteří mi byli oporou.

Obsah

1. Úvod a cíl práce.....	6
2. Literární přehled.....	8
2.1. Molekulární charakteristika.....	8
2.2. Metody studia fytoplazem.....	9
2.3. Reakce fytoplazem na tetracyklin.....	10
2.4. Životní cyklus fytoplazem a jejich šíření	11
2.5. Příznaky napadených rostlin	12
2.6. Ochrana proti šíření fytoplazmových onemocnění.....	13
3. Materiál a metody	14
3.1. Materiál	14
3.2. Izolace DNA	15
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	17
3.4. Analýza délkového polymorfizmu restrikčních fragmentů (RFLP)	19
3.5. Příprava reagensů	20
4. Výsledky a diskuze	21
5. Závěr	23
6. Seznam použité literatury	24
7. Přílohy	31
Tab. 1	32
Obr. 1A	33
Obr. 1B	34
Obr. 2A	35
Obr. 2B	36

Obr. 3A	37
Obr. 3B	38
Obr. 3C	39
Obr. 3D	40

1. Úvod

Jabloně a hrušně patří mezi nejpěstovanější ovocné dřeviny v České republice. U nás je pěstováno přes tisíc odrůd jablek a sto čtyřicet odrůd hrušní. Světová produkce hrušek přesahuje 17 milionů tun v roce. Z toho přes 51 procent se sklídí v Číně, za níž následují USA, Itálie a Španělsko (FAO, 2003).

Ovocné stromy jsou postihovány onemocněními, způsobenými různými parazity. Nejčastější houbové choroby hrušní jsou strupovitost (*Venturia pirina*) a rez hrušková (*Gymnosporangium sabinae*). K nejvíce se vyskytujícím hmyzím škůdcům snižujících úrodu ovoce patří pilatka hrušňová (*Hoplocampa brevis*) a štítenky. Hrušně jsou postihovány i viry, způsobujícími například kaménkovitost plodů.

Méně známí vnitrobuněční parazité hrušní, ostatních ovocných dřevin i bylin, jsou fytoplazmy. Jedná se o jednoduché prokaryotní organismy bez buněčné stěny, ohraničené pouze jednotkovou, trojvrstevnou plazmatickou membránou. Mají kulovitý, oválný i pleiomorfí tvar. Nejčastěji jsou popisovány oválné částice o velikosti 500 nm (jejich rozměry se ale mohou pohybovat od 80 do 800 nm) (Doi a kol., 1967; Ishii a kol., 1967), pokud jsou částice protáhlé, dosahují délky až 1600 nm. Fytoplazmy mají specifické nároky na životní podmínky, proto je můžeme nalézt pouze v rostlinném floému (v sítkovicích rostlin), nebo ve hmyzí hemolymfě. S tím úzce souvisí i přenos fytoplazem: vegetativním šířením např. rouby a očky, a pomocí hmyzích vektorů. Těmi jsou především mery (*Psyllidae*) a křísi (*Auchenorrhyncha*). Na napadených rostlinách fytoplazmy vyvolávají řadu příznaků, jako např. žloutenku, malolistost, proliferaci výhonů i kořenů, zakrslost, virescenci, fylodii, květní sterilitu, odumírání výhonů i celých rostlin.

Pro morfologickou podobnost s mykoplazmami napadající živočichy byly fytoplazmy dlouho nazývány "mycoplasma-like organisms, MLO". Od roku 2004 se prosadilo označení druhu '*Candidatus Phytoplasma*', a to na základě sekvenční příbuznosti 16S rDNA. Fytoplazmy se taxonomicky řadí do třídy *Mollicutes* a oddělení *Tenericutes*. Molekulárními analýzami genu pro 16S rDNA byly fytoplazmy rozděleny do 14 skupin a 41 podskupin (Lee a kol., 1998), přičemž počet podskupin se s přibývajícím poznatky neustále rozšiřuje.

Chřadnutí hrušní (pear decline), jehož původcem je '*Candidatus Phytoplasma pyri*', je závažné onemocnění hrušní, které se objevuje v mnoha zemích, kde se hrušně pěstují. Poprvé bylo popsáno v Itálii a způsobuje značné škody v Evropě a Severní Americe (Caglayan a kol., 1999). Jako příklad devastace úrody může sloužit případ z Kalifornie z roku 1959, kdy odumřelo přes milion hrušní následkem fytoplazmového odmírání hrušní. Stromy, které nákazu přežily, měly snížený výnos prodejných plodů (Hibino a Schneider, 1970).

Rostliny infikované fytoplazmami je velmi problematické ozdravit. Fytoplazmovým onemocněním je proto třeba předcházet za pomoci preventivních opatření, z nichž nejdůležitější je používání zdravého výchozího množitelského a šlechtitelského materiálu, pěstování odolnějších odrůd, eliminace výskytu hmyzích vektorů, včasná diagnostika fytoplazmové infekce a odstranění napadených stromů, popř. rostlin, které mohou být potenciálními zdroji infekce.

K detekci a identifikaci fytoplazem se využívají zejména metody molekulární biologie. Mezi ně patří polymerázová řetězová reakce (PCR), následné štěpení enzymy (RFLP), případně sekvencování. Pro certifikaci ovocných dřevin se často využívají biologické testy na dřevinných indikátorech. K testování fytoplazmy chřadnutí hrušně se podle doporučení EPPO nejčastěji používá hrušeň Doyenné du Comicé nebo *Pyronia veitchii*, reagující svinutkou, zkrabacením listů a jejich předčasným červenaním.

Cílem předkládané práce bylo pomocí molekulárních metod detegovat a identifikovat fytoplazmy v hrušních z genofondu, šlechtitelského a množitelského materiálu z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy.

Ke splnění tohoto úkolu bylo nutné prakticky zvládnout následující metody:

- izolaci DNA chloroform-fenolovou metodou
- detekci přítomnosti fytoplazem pomocí PCR (direct, nested, další nested)
- identifikaci fytoplazem restrikčním štěpením různými enzymy

2. Literární přehled

2.1. Molekulární charakteristika

Chromosom fytoplazem je velmi malý (680 – 1600 kb) (Bertaccini, 2007). Podle Oshimy a kol. (2002) je genom fytoplazem - konkrétně fytoplazmy žloutenky aster - minimální genom zabezpečující základní funkce parazitického organismu, jeho adaptaci na vnější podmínky a evoluci. Obsahuje geny nezbytné pro uskutečnění hlavních molekulárních funkcí, jako jsou replikace, transkripce a translace. Bai a kol. (2006) uvádí, že fytoplazmy jsou též schopné syntetizovat vlastní membránové fosfolipidy. Naopak absence fosfotransferázového systému pro tvorbu glukóza-6-fosfátu v průběhu glykolýzy vedla k teorii, podle níž je minimální genom fytoplazem důsledkem jejich evoluce, tedy jako adaptace ke způsobu života obligátních vnitrobuněčných parazitů (Oshima a kol., 2004; Oshima a Namba, 2005).

S použitím DNA sond byla u fytoplazem prokázána také přítomnost extrachromozomální DNA připomínající plazmid. Tato kruhová dvouvláknová DNA se může u různých kmenů lišit. (Bertaccini, 2007). Bai a kol. (2006) však tuto informaci významně rozšiřuje: na plazmidech fytoplazem identifikoval geny kódující například transponázu (*tra5*), sigma faktor (*sigF*), DNA-vazebný faktor HU, ZN-dependentní proteázu (*hflB*), thymidylát kinasu (*tmk-a*), DNA helikázu (*dnaB*), DNA primasu (*dnaG*) a ATPasu (*mgsI*).

Od mykoplazem způsobujících onemocnění lidí a zvířat se fytoplazmy odlišují přítomností tzv. spacer regionu, neboli mezerníku, mezi ribosomální oblastí 16S a 23S. Tento mezerník představuje úsek veliký přibližně 300 pb a kóduje isoleucin tRNA ($tRNA^{Ile}$) a část sekvence pro alanin tRNA ($tRNA^{Ala}$). Sekvencování všech rRNA genů dvou fytoplazmových kmenů vedlo k objevu unikátního znaku fytoplazem, a to že tRNA kódující aminokyseliny valin a asparagin jsou umístěny směrem od 5' S rRNA směrem k 3' konci.

Fylogenetické studie předpokládají, že společný předek fytoplazem je *Acholeplasma laidlawii*, u které kóduje tryptofan triplet UGG. U ostatních prokaryot

zahrnující také mykoplazmy a spiroplazmy je tryptofan kódován tripletem UGA (Bertaccini, 2007).

2.2. Metody studia fytoplazem

Za původce dnešních fytoplazmových onemocnění byly dlouhou dobu považovány viry. V roce 1967 však Doi a kol. pozorovali ve floému aster s příznaky žloutenky, zakrslých moruší a metlovitých paulovnií pomocí elektronového mikroskopu oválné buňky připomínající mykoplazmy.

Počátky výzkumu fytoplazem byly spojeny s hledáním způsobů jejich identifikace. Nejprve se při rozlišování a určování fytoplazem spolehalo především na jejich biologické vlastnosti, kterými jsou například specifita k rostlinnému a hmyzímu hostiteli a příznaky napadené rostliny (Golino a kol., 1989). Určení biologických vlastností bylo časově náročné, pracné a někdy i nespolehlivé (Lee a Davis, 1992; Lee a kol., 1992). Ačkoliv různé druhy fytoplazem kolonizují pouze vybrané druhy rostlin (spektrum hostitelských rostlin je velmi široké u fytoplazmy žloutenky aster či stolburu, naopak fytoplazmy ovocných dřevin mají okruh hostitelů velmi úzký), většina je schopna infikovat rostlinu *Catharanthus roseus* (barvínek růžový). Z toho důvodu se v laboratorních podmínkách *C. roseus* využívá jako indikátorová rostlina. Na infekci různými fytoplazmami reaguje vytvořením odlišných symptomů. Z nemocné rostliny je možné fytoplazmy na *C. roseus* přenést haustórií parazitické rostliny kokotice (*Cuscuta spp.*), roubováním nebo hmyzími vektory.

V současné době se jako nejrychlejší a nejspolehlivější postupy k detekci a identifikaci fytoplazem používají molekulární metody. Nejčastěji je to polymerázová řetězová reakce (PCR), zejména v kombinaci s analýzou délkového polymorfismu restričních fragmentů. Univerzální i skupinově specifické primery pro detekci fytoplazem byly odvozeny od sekvence 16S rDNA genu a později od sekvencí pro geny ribozomálních proteinů, SecY a Tuf genů a genů kódujících proteiny asociované s membránami fytoplazem (imp). (Fránová, 2008).

Skupiny a podskupiny fytoplazem lze rozlišit pomocí délkového polymorfismu restričních fragmentů (RFLP). Amplifikované segmenty fytoplazmové DNA se naštěpí za pomoci restričních enzymů (např. *AluI*, *HhaI*, *MseI*, *KpnI*, *RsaI*, *SspI*, *TruI*) a naštěpené produkty se separují nejčastěji vertikální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu, barví se etidium bromidem a k vizualizaci se používá UV transiluminátor. Porovnáním restričních profilů s kontrolními vzorky nebo literárními údaji je možné danou fytoplazmu identifikovat (Lee a kol., 1998).

Dalšími metodami identifikace fytoplazem jsou sekvencování (nejčastěji se stanovuje sekvence 16SrDNA-23SrDNA oblasti, případně dalších genomových oblastí) a dot blot hybridizace (využívá jako detekčních sond náhodně klonované fragmenty chromozomální DNA fytoplazem) (Kirkpatrick a kol., 1987).

Dosud se nepodařilo vypěstovat kulturu fytoplazem na živné půdě *in vitro*. K vytvoření vhodných podmínek pro kultivaci fytoplazem je důležité znát fytoplazmový genom. Oshima a kol. (2004) a Bai a kol. (2006) osekvenovali genom dvou fytoplazem. V roce 2003 byla kompletně osekvenována fytoplazma žloutenky aster - izolát Onion yellows phytoplasma OY-M. Druhý v pořadí byl osekvenován izolát žloutenky aster - Aster yellows witches' broom phytoplasma (AYWB). Díky zjištěným sekvencím se naskýtá nový pohled, který může vést nejen k přípravě média, poskytujícího fytoplazmám všechny esenciální látky, ale i k vývoji diagnostických testů na fytoplazmy (Hougenhout, 2008).

2.3. Reakce fytoplazem na tetracyklin

Na rozdíl od rostlinných virů může být většina bakteriálních původců onemocnění citlivá na léčbu, pokud se jedná o mikroorganismy mající vlastní, od hostitelské rostliny odlišný metabolismus. Fytoplazmy reagují na antibiotika tetracyklinové řady aplikované rostlinám imerzí nebo injekčně. V průběhu léčby tetracyklinem dochází u infikovaných rostlin k ústupu příznaků. Po určité době od ukončení aplikace se však symptomy infekce objevují znovu. Podávání tetracyklinu tedy musí být kontinuální, nebo opakované v pravidelných intervalech. Tetracykliny jsou rozpustné ve vodě a jsou v rostlině transportovány cévami. Metoda toku infuze

samospádem byla komerčně použita při ochraně hrušní proti fytoplazmě chřadnutí hrušní v Kalifornii. Opakované ošetřování však činí tento způsob kontroly infekce nákladným a pro většinu plodin nepraktickým. Testovaný penicilín, který u bakterií blokuje tvorbu buněčné stěny, je u zástupců třídy *Mollicutes* zcela neúčinný, protože u nich se pevná buněčná stěna nevytváří (Bos, 1999).

2.4. Životní cyklus fytoplazem a jejich šíření

Fytoplazmy ke svému přežití potřebují hypotonické prostředí (Bertaccini, 2007). Buňky fytoplazem jsou pleiomorfni a dostatečně malé na to, aby mohly proniknout póry sítkových políček z jedné sítkovice do druhé. Pohyb a distribuce fytoplazem však zřejmě není uskutečňován pouze pomocí toku asimilátů. Další mechanismy pohybu fytoplazem nejsou známy, a tak zůstává neobjasněno, jak se např. dostávají do průvodních buněk sítkovic (Rudzinska-Langwald a kol., 1999). Kolonizují floém všech částí rostlin, včetně květních orgánů (Clark a kol., 1986). Výskyt fytoplazem v různých částech rostliny se v našich klimatických podmínkách během roku mění - v zimním období se koncentrují ve funkčních sítkovicích radiálního floému a na jaře rekolonizují nadzemní části rostliny (Schaper a Seemüller, 1984), u druhů *Prunus* se v sítkovicích nadzemních částí nacházejí životaschopné fytoplazmy i během zimních měsíců (Jarausch a kol., 1999).

Mezi běžné hmyzí vektory fytoplazem patří zástupci řádu stejnokřídlých (*Homoptera*), a to zejména čeledi merovitých (*Psyllidae*), křískovitých (*Cicadellidae*) a žilnatkovitých (*Cixiidae*). Význam při přenosu fytoplazem je v literatuře připisován i čeledi ploštic (*Hemiptera*) a klopuškovitým (*Miridae*) (Banntari a Zeyen, 1979; Grylls, 1979; Nelson, 1979; Tsai, 1979). Fytoplazmy jsou hmyzími vektory přenášeny cirkulativně, propagativně a perzistentně. Fytoplazma se do ústní dutiny bodavě svého hmyzu dostane během dostatečně dlouhého akvizičního sání na infikované rostlině. Dále penetruje epitelové buňky, kde se replikuje v měchýřcích a poté přes bazální membránu vstupuje do tělní dutiny, koluje v hemolymfě a opět se pomnožuje. Pokud fytoplazma překoná další membránové bariéry, pronikne do acinárních buněk slinných žláz a prodělá zde další množení. Při exkreci slin se během sání dostává do nového

hostitele (Tsai, 1979). Alma a kol. (1997) uvádí, že fytoplazmy infikují také hmyzí vajíčka.

Vegetativně se fytoplazmy šíří pomocí roubů z infikovaných rostlin, které mohou být ještě zcela bezpříznakové, pokud u nich probíhá infekce latentně. Běžný je přenos např. hlízami, oddenky, cibulemi a řízky. Některé práce však uvádějí přítomnost fytoplazem i v semenech - konkrétně v embryích palmy kokosové (Cordova a kol., 2003), dále semenech a v semenáčcích vojtěšky (Khan a kol., 2002), a to i přesto, že chybí přímé spojení sítkovic květních částí a vyvíjejícího se embrya. Z hlediska prevence vegetativního šíření fytoplazem je důležité používat zdravé výchozí množitelské materiály. Za tímto účelem se provádí ozdravení pomocí termoterapie a meristémové kultury. Rozmnožovací materiály (rouby) se často máčí ve vodě teplé 45-54 °C po dobu nejméně půl hodiny, maximálně však osm hodin (Bos, 1999).

Některé fytoplazmy jsou přenášeny celou řadou hmyzích vektorů (žloutenku aster přenáší 24 druhů kříšů), jiné jsou přenášeny jen několika či dokonce jen jediným druhem (Lee a kol., 2003). Dynamika a efektivita přenosu fytoplazem záleží také na vývojovém stádiu a pohlaví vektora. Samičky křísa *Macrosteles quadrilineatus* přenášejí fytoplazmu žloutenky aster mnohem efektivněji než samečci (Beanland a kol., 1999). Ačkoliv mohou mít fytoplazmy velmi negativní dopad na některé druhy hmyzích vektorů, většinou hmyzu přímo neškodí a dokonce příznivě ovlivňují jejich plodnost a životaschopnost. Studie ukazují, že přítomnost fytoplazem ovlivňuje chování a výběr rostlinných druhů, kterými se hmyz živí (Hogenhout, 2008).

2.5. Příznaky napadených rostlin

Fytoplazmy vyvolávají u infikovaných rostlin různé příznaky včetně žloutenky a svinutky listů, chlorózy, malolistosti, proliferace výhonů i kořenů, zakrslosti, virescence, fylodie, květní sterility, odumírání výhonů a celých rostlin. (Fialová, 2008). Na napadených rostlinách se však mohou projevit příznaky v závislosti na druhu fytoplazmy a stadiu infekce. Rozhodující je také druh napadené rostliny, neboť některé rostliny mohou být vůči fytoplazmové infekci tolerantní či rezistentní (Lee a kol., 2000).

Popisována je i tzv. spontánní remise příznaků u infikovaných dřevin, zejména u jabloní infikovaných fytoplazmou proliferace jabloně. Přestože dojde k eliminaci patogena z koruny, v kořenech zůstávají fytoplazmy životaschopné (Loi a kol., 2002).

Pro hrušně (ale také kdouloň obecnou) představuje nebezpečí nákazy fytoplazma '*Ca. Phytoplasma pyri*' (Pear decline phytoplasma.) způsobující onemocnění chřadnutí hrušní. Je podstatně rozšířenější než fytoplazma proliferace jabloně. Na listech je napadení rozpoznatelné díky jejich nápadnému svinování a chlorotickému zbarvení, listové čepele bývají menší a na konci vegetace dochází často k zavádání, červenání a nakonec hnědnutí listů. Větve napadených stromů mají menší přírůstky, někdy vyholují nebo dochází k metlovitosti. Větve s příznaky napadení předčasně odumírají a později odumírají i celé napadené stromy. U příznaků není popisována spontánní remise. (Růžička, 2008). Fytoplazmy chřadnutí hrušně společně s fytoplazmou proliferace jabloně patří do stejné ribozomální skupiny 16Sr X (apple proliferation group).

2.6. Ochrana proti šíření fytoplazmových onemocnění

V současné době stále není znám způsob, kterým by bylo možné ozdravit rostliny napadené fytoplazmami. Ačkoliv jsou fytoplazmy na aplikaci tetracyklinu citlivé, po ukončení terapie se symptomy typické pro fytoplazmózy znovu projevují. Antibiotika pouze potlačí příznaky, avšak jejich dlouhodobější aplikace působí fytotoxicky, dále může vést i ke vzniku rezistentních bakteriálních kmenů.

Protože některé fytoplazmy působí značné škody na hospodářsky významných plodinách, byla v r. 1977 přijata karanténní opatření pro řadu fytoplazem, z nichž se na našem území vyskytuje fytoplazma způsobující proliferaci jabloně ('*Ca. Phytoplasma mali*'), onemocnění evropské žloutnutí peckovin (ESFY) ('*Ca. Phytoplasma prunorum*'), chřadnutí hrušně ('*Ca. Phytoplasma pyri*') a stolbur ('*Stolbur Phytoplasma*') (Růžička, 2008).

Nejúčinnějším postupem zabraňujícím šíření fytoplazem zůstávají preventivní opatření. Fytoplazmy v latentním stádiu infekce nezpůsobují žádné symptomy na hostitelské rostlině, mohou se nepozorovaně šířit vegetativním množением napadené rostliny i šňávu sajícím hmyzem. Důležité je proto používat pro množení rostlin

fytoplazem prostý certifikovaný materiál, odstraňovat zdroje infekce - především infikované vytrvalé a dvouleté rostliny, stejně jako všechny příznakové rostliny, omezit pěstování vnímavých druhů a kultivarů vůči fytoplazmám a naopak se zaměřit na tolerantní, méně vnímavé kultivary a kontrolovat výskyt hmyzích vektorů v porostu (Cousin a Boudon - Padieu, 2002).

K odrůdám jabloní náchylným k fytoplazmové proliferaci jabloně patří Alkmene, Boskopské, Grafštyňské, Starking, Golden Delicious a Banánové zimní (Růžička, 2008). V Německu probíhají pokusy zaměřené na selekci jabloňových podnoží odolných vůči fytoplazmě proliferace jabloně (Jarausch a kol., 2008), přirozený gen rezistence proti fytoplazmám byl však dosud nalezen pouze u planého apomiktického druhu *Malus sieboldii* (Kartte and Seemüller, 1988, 1991; Seemüller a kol., 1992).

Z pohledu genového inženýrství se nabízí jako řešení introdukovat do rostlinného genomu geny, které kódují molekuly interferující s životním cyklem fytoplazem a tak navozující zvýšenou odolnost, nebo geny, například pro lektiny, které jsou toxické pro hmyzí vektory (Du-Tao a kol., 2005; Hong a kol., 2001).

Následující pasáž o rozsahu 36 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultně JU.