

IMPROVEMENT OF PCR METHOD FOR DIAGNOSTICS OF ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Využití metody PCR pro diagnostiku kořenového hádátka *Meloidogyne incognita*

Blanka TESAŘOVÁ, Miloslav ZOUHAR, Pavel RYŠÁNEK
KOR AF ČZU

Souhrn, klíčová slova

Vzhledem ke značné škodlivosti hádátek je nezbytné mít přesnou a rychlou metodu jejich detekce. Byly navrženy genetické markery pro identifikaci *Meloidogyne incognita* a postup ověřen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Rod *Meloidogyne*, PCR, genetický marker, extrakce.

Summary, keywords

It is indispensable to have accurate and speedy method of nematodes detection considering their great deal of malignancy nematodes. For identification of *Meloidogyne incognita* genetic primers were designed and the procedure was attested by Polymerase Chain Reaction

Genus *Meloidogyne*, PCR, primer, extraction.

Introduction - Úvod

Hádátka rodu *Meloidogyne* jsou globálně rozšířena a škála jejich hostitelských rostlin je velmi pestrá. Tito rostlinní parazité se stali v posledních desetiletích předmětem vědeckých výzkumů většiny států světa. Parazitují na kořenech mnoha kulturních i divoce rostoucích rostlin. Ekonomické ztráty spočívají v redukcí výnosu a ve snížení kvality sklizených plodin. Proto jsou některé druhy (*M. fallax*, *M. chitwoodi*) řazeny mezi karanténní organismy.

Hádkotvorná kořenová hádátka jsou endoparazité. Jejich životní cyklus probíhá sice částečně vně kořenů, ale hlavní část života tráví sedenterním způsobem. Hádátka pronikají i do špiček kořenů. Jejich výměšky dráždí kořeny k tvorbě hádkovitých novotvarů. Pohlavně dospělé samice zduří a kladou do hálek vajíčka, z nichž se brzy líhne další generace.

Po rozpadu hálek se uvolňují čerstvě kladená vajíčka do půdy, kde mohou delší čas přetrvávat (Decker, 1969).

Methods - Metody

Napadené rostliny byly umístěny ve fytopatologickém skleníku agronomické fakulty. Jako vhodní hostitelé hádátka *Meloidogyne incognita* se osvědčily rostliny: rajčata (*Lycopersicon esculentum*), okurky (*Cucumis sativus*), a celer (*Apium graveolens*). Zamořená půda byla odebrána z kóji, kde se pěstovala napadená rajčata, nebo byla přímo infikována hádkami z napadené rostliny ibišku. Jednotlivé samičky byly z hálek vypreparovány pomocí jehly. DNA byla extrahována ze samiček, z hálek a z půdy.

Získaný materiál byl homogenizován v roztoku TE, TNE a CTAB. Pro izolaci čisté NK jsme využili metodu extrakce fenolem. Velice často se fenol kombinuje s chloroformem. Ten denaturuje proteiny, rozpouští a tím odstraňuje lipidy.

V dalších krocích bylo nutné optimalizovat metodu PCR. Podstatou PCR je vysoce citlivý způsob amplifikace i malého množství DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA vzorku se při hybridizují krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nové DNA dependentní DNA polymerázou. V reakčním prostředí jsou přítomny deoxynukleotidy, které představují stavební kameny pro nově syntetizovanou DNA. Pro výběr primerů byla využita databáze na internetu NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Primery byly navrženy ze sekvence DNA kódující esophageal gland protein SEC-1 byly pojmenovány MIGF a MIGR:

Forward: MIGF = GGGCAAGTAAGGATGCTCTG

Reverse: MIGR = GCACCTCTTTCATAGCCACG

Primerové sekvence byly vybrány tak, aby měly nejméně 50% G+C obsahu a nevytvářely sekundární druhotnou strukturu. K vizualizaci získaných produktů byla použita 1% agarozová elektroforéza. Získaný fragment je 502 bp dlouhý.

Results - discussion – Výsledky - diskuse

V této práci byl navrhnout a ověřen postup determinace hádkotvorného kořenového hádátka *Meloidogyne incognita* metodou PCR (Polymerázová řetězová reakce).

Díky částečně osekvcovanému genomu přístupnému na internetu bylo možno navrhnout vhodné primery.

Vzorky byly pipetovány do celkového objemu 25 µl. Na navržené primery se osvědčila teplota annealingu 60 °C. Vypočtená Tm 62 °C byla při navrhování reakce snížena o 5 °C. Požadovaného výsledku se však nedosáhlo, proto byla teplota annealingu zvýšena na 60 °C, kdy k nasednutí primeru došlo. Zijlstra (1997) použila postup k optimalizaci teploty annealingu, kdy se v prvních 5 cyklech nastaví počáteční teplota 55 °C po dobu 30 sekund a v každém cyklu je tato teplota snížena o 1 °C.

Počet cyklů byl upraven tak, aby bylo dosaženo dostatečné amplifikace DNA. Opakování 34x se neosvědčilo, proto se počet cyklů zvedl na 40 opakování při použití DNA extrahované ze samiček nebo z hálek. Při pokusu DNA z půdy bylo dostatečné množství amplifikované DNA dosaženo při 50 cyklech. Harris *et al.* (1990) použil postup, kdy byl počet cyklů postupně prodlužován o 5 cyklů, při počtu 25-40. V některých případech postačuje i 20 cyklů (Zijlstra *et al.*, 1995). Pro *Meloidogyne hapla* bylo optimální 35 cyklů (Williamson *et al.*, 1997).

Funkčnost postupu byla ověřena při optimalizaci reakce při různých koncentracích hořečnatých iontů a různě zředěné DNA.

Tato metoda přispívá do bohatého spektra metod diagnostiky rostlinných parazitických hádátek. Naší snahou bylo optimalizovat tuto metodu, aby se dala využívat v rutinní diagnostice.

References - Použitá literatura

K dispozici u autorů