

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Michaela Martinusíková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



***Molekulární variabilita populací
fytoplazmy stolburu v rostlinných
hostitelích***

Diplomová práce

Michaela Martinusíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Daně Šafářové, PhD. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Mgr. Daně Šafářové, PhD. za její ochotu, trpělivost, odborné rady a čas, který mi věnovala při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů na Katedře buněčné biologie a genetiky za jejich pomoc při práci v laboratoři.

Souhrn

Fytoplazmy jsou prokaryotní jednobuněčné organismy, postrádající buněčnou stěnu. Přežívají a rozmnožují se ve floému rostlin nebo v hemolymfě hmyzích přenašečů. V hostitelských rostlinách mohou fytoplazmy způsobit širokou škálu příznaků, jako například sterilitu, chlorózy, odumírání rostlin, zakrslost, žloutnutí nebo svinování listů, což vede ke snížení kvality a množství výnosů. Fytoplazmy jsou detekovány pomocí různých laboratorních metod, z nichž nejpoužívanější jsou metody 'nested' PCR a kvantitativní PCR.

Významným zástupcem fytoplazem je fytoplazma stolburu, která infikuje především révu vinnou a kulturní plodiny z čeledi lilkovitých a miříkovitých, a jejímž hlavním přenašečem je *Hyalesthes obsoletus*. Velký význam pro šíření fytoplazmy stolburu mají rezervoárové plevelné rostliny, jako například kopřiva dvoudomá a svlačec rolní.

Tato diplomové práce překládá literární přehled o fytoplazmě stolburu a její genetické variabilitě. Experimentální část je zaměřena na studium genetické variability populací fytoplazmy stolburu v rostlinných hostitelích (pcháč rolní, rajče jedlé, svlačec rolní, réva vinná) a hmyzím vektoru (žilnatka vironosná) pomocí amplifikace genů *stamp* a *vmp1*, sekvencování a bioinformatické analýzy. *In silico* RFLP analýza *vmp1* genu prokázala přítomnost dvou odlišných genotypů. U izolátů fytoplazmy stolburu původem z révy vinné, pcháče rolního a *Hyalesthes obsoletus* byl identifikován *vmp1* profil I a izolátů fytoplazmy stolburu původem ze svlačce rolního byl identifikován *vmp1* profil V. V rámci vybraného souboru vzorků vykazoval *stamp* gen vyšší genetickou variabilitu než *vmp1* gen, žádný z těchto genů ale neumožnil rozlišení izolátů na základě hostitelské specifity nebo geografického původu. Na základě analýzy haplotypů, jak v rámci *stamp*, tak v rámci *vmp1* genu, bylo zjištěno, že populace fytoplazmy stolburu v jednotlivých hostitelích není homogenní, byla detekována různá míra jednonukletidového polymorfismu s vyšší mírou nesynonymních mutací. Populace fytoplazmy stolburu z rajčete jedlého, révy vinné a *Hyalesthes obsoletus* vykazovaly malou variabilitu, která vznikla v důsledku jednonukleotidových mutací pouze v rámci daného rostlinného hostitele nebo vektoru. A však populace fytoplazmy stolburu z pcháče rolního a svlačce rolního vykazovaly velkou variabilitu, ke které pravděpodobně došlo směsnou infekcí.

Summary

Phytoplasmas are the prokaryotic unicellular organisms lacking the cell wall. They are living parasitically in the plant phloem or in the hemolymph of insect vectors. Phytoplasmas induce in the host plants the wide range of symptoms such as sterility, chlorosis, necrosis and plant dying, dwarfing, yellowing or leaf rolling, that could lead to the decreasing of the quality and crop yield. Phytoplasmas are detected using the various laboratory methods, the most often used methods are the nested PCR and quantitative PCR.

The stolbur phytoplasma belongs to the economically important phytoplasmas. It is infecting grapevine and various solanaceous and apiaceous cultural crops, The most important stolbur vector is *Hyalesthes obsoletus* Signoret. The reservoir weed plants, such as nettle and bindweed, have the great importance for the stolbur phytoplasma spreading.

The theoretical part of this diploma thesis is reviewing problematics of stolbur phytoplasma and its genetic variability. The experimental part is focused on the study of genetic variability of stolbur phytoplasma populations infecting the different plant hosts (creeping thistle, tomato, bindweed, grapevine) and the insect vector (*Hyalesthes obsoletus*). The presence of the two different genotypes was detected using the *in silico* RFLP analysis of *vmp1* gene. The *vmp1* profile I was identified among the stolbur phytoplasma isolates obtained from the grapevine, creeping thistle and *Hyalesthes obsoletus*, the *vmp1* profile was identified among the isolates obtained from the bindweed. The *stamp* gene showed in the selected set of samples the higher variability than *vmp1* gene. None of them allowed the isolates discrimination according the host specificity or geographical origin. Haplotype analysis based on the both *stamp* and *vmp1* genes showed that the stolbur phytoplasma population in the hosts is not homogeneous, the various range of single polymorphism and the higher frequency of non-synonymous mutations was detected. It was found the small phytoplasma variability of tomato, grapevine and *Hyalesthes* populations, this polymorphism is the result of the single mutation accumulation due to phytoplasmas replication within the host plant or vector. The higher variability was identified among the stolbur phytoplasmas identified in the populations from the creeping thistle and bindweed. The detected haplotype variability could be explained as a result of the mixed infection originating from the repetitive infection of the host plants.

Obsah

1. Cíle práce	9
2. Úvod	10
3. Literární přehled	11
3.1 Fytoplazmy	11
3.2 Historie objevu fytoplazem	11
3.3 Obecná charakteristika fytoplazem	12
3.4 Klasifikace fytoplazem	13
3.5 Způsob přenosu a šíření fytoplazem	15
3.6 Příznaky infekce fytoplazmami	16
3.7 Ekonomický význam fytoplazem	16
3.8 Detekce fytoplazem	16
3.8.1 Elektronová mikroskopie	17
3.8.2 Fluorescenční mikroskopie	17
3.8.3 PCR (polymerázová řetězová reakce)	17
3.8.4 Kvantitativní PCR	18
3.8.5 RFLP (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)	18
3.8.6 IPhyClassifier	18
3.8.7 Sekvencování	19
3.8.8 Biologická detekce	19
3.9 Fytoplazma stolburu	19
3.9.1 Taxonomie	19
3.9.2 Hostitelský okruh	20
3.9.3 Příznaky infekce	21
3.9.4 Vektorový přenos	21
3.9.5 Geografické rozšíření	22
3.9.6 Genetická variabilita fytoplazmy stolburu	22
3.9.6.1 Genetická variabilita <i>stamp</i> genu	23
3.9.6.2 Genetická variabilita <i>vmp1</i> genu	23
3.9.6.3 Genetická variabilita dalších genů	25
3.9.7 Fytoplazma stolburu v České republice	26

4. Materiál a metody	27
4.1 Rostlinný materiál	27
4.2 PCR amplifikace cílových genů	27
4.3 Detekce PCR produktu	29
4.4 Izolace PCR produktu z gelu	30
4.5 Klonování PCR produktu	31
4.5.1 Ligace DNA do plazmidu	31
4.5.2 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	31
4.5.3 Skríníng pozitivních kolonií pomocí PCR	32
4.5.4 Uchovávání transformovaných bakterií	33
4.5.5 Složení a příprava pracovních roztoků	33
4.6 Sekvenační značení	34
4.7 Analýza sekvencí	36
4.8 <i>In silico</i> RFLP analýza	36
4.9 Přístrojové vybavení laboratoře	36
5. Výsledky	37
6. Diskuse	56
7. Závěr	61
8. Seznam použitých zkratk	62
9. Seznam použité literatury	63

1. Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo vypracování literární rešerše na téma Variabilita populací fytoplazmy stolburu v rostlinných hostitelích.

Cílem praktické části byla detekce fytoplazmy stolburu pomocí 'nested' PCR, amplifikace vybraných genů (*vmp1*, *stamp*) a stanovení molekulární a sekvenční variability populací stolburu.

2. Úvod

Fytoplazmy náleží do oddělení *Tenericutes*, třídy *Mollicutes*. Jsou to významné patogeny, které parazitují v sítkovicích rostlin a tím mohou způsobit různé choroby, které mohou zapříčinit značné ekonomické ztráty. Významným zástupcem fytoplazem je karanténní fytoplazma stolburu, která infikuje révu vinnou a způsobuje její onemocnění označované ve Francii jako Bois noir, v Itálii Legno Nero a v Německu Vergilbungskrankheit. Dalšími často fytoplazmou stolburu infikovanými hospodářsky významnými rostlinami jsou především brambor, rajče, paprika, celer a lilek. Hlavním přenašečem fytoplazmy stolburu žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus* Signoret). Z geografického hlediska je fytoplazma stolburu rozšířena téměř v celé Evropě a dále pak v Číně, Japonsku a Indii.

Cílem této diplomové práce bylo zjištění molekulární variability populací fytoplazemy stolburu v rostlinných hostitelích a hmyzím vektoru.

3. Literární přehled

3.1 Fytoplazmy

Fytoplazmy představují monofyletickou skupinu organismů náležící do oddělení *Tenericutes*, třídy *Mollicutes* (Kube a kol., 1993). Mohou přežívat a rozmnožovat se pouze ve floému rostlin nebo v hemolymfě hmyzu, který je přenáší, což jsou především mery a křísi (Seemüller a Schneider, 2004). Vyvinuly se pravděpodobně z grampozitivních bakterií skupiny laktobacilů redukcí genomu a ztrátou vnější buněčné stěny (Bai a kol., 2006; Bertacci, 2007; Hogenhout a kol., 2008).

Fytoplazmy jsou ekonomicky významní původci mnoha onemocnění planých i kulturních plodin.

3.2 Historie objevu fytoplazem

Fytoplazmy byly objeveny v roce 1967 Dr. Doi a jeho spolupracovníky. V elektronovém mikroskopu pozorovali ve floému aster prokaryontní buňky bez buněčné stěny. Morfologicky a ultrastrukturou byly tyto organismy podobné živočišným mykoplazmatům, a proto byly označeny jako „MLOs“ („mycoplasma-like organisms“). Neúspěšné pokusy o izolaci a kultivaci *in vitro* těchto organismů probíhaly tři desetiletí. Z toho důvodu bylo velmi těžké tyto organismy charakterizovat a určit jejich taxonomické zařazení. Až na základě sekvenční analýzy 16S rDNA a ribozomálních proteinů bylo zjištěno, že „MLOs“ tvoří monofyletickou skupinu a byly zařazeny do třídy *Mollicutes* (Gundersen a kol., 1994).

The International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB), Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes* v roce 1993 stanovila, že označení „MLOs“ bude nahrazeno termínem fytoplazma. V roce 2004 byl pro označení druhu fytoplazmy zaveden název „*Candidatus phytoplasma*“ (Firrao a kol., 2004).

3.3 Obecná charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou prokaryotní jednobuněčné organismy, kulovitěho nebo oválného tvaru s variabilní velikostí 200 – 800 nm. V počátečních stádiích infekce se mohou vyskytovat i ve vláknité a větvené formě. Fytoplazmy postrádají buněčnou stěnu, mají pouze plazmatickou membránu, která odděluje cytosol od okolí (Firrao a kol., 2004).

Genom je u většiny fytoplazem představován kruhovým chromozomem, který se nachází například u '*Ca. Phytoplasma australiense*' nebo u Onion Yellow's Phytoplasma (OY-M) a Aster yellow's witches'- broom phytoplasma (AY-WB) patřících do druhu '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma asteris*'. V případě izolátu AP fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma mali*' bylo zjištěno, že má lineární chromozóm (Bai a kol., 2006; Kube a kol., 2008; Oshima a kol., 2004; Tran-Nguyen a kol., 2008). Chromozómy fytoplazem jsou velice malé, velikost se pohybuje v rozmezí 530 – 1350 kb (Marcone a kol., 1999). Genom fytoplazem má nízký obsah cytosinových a guaninových bází, asi 23 – 29 % (Bai a kol., 2006; Tran-Nguyen a kol., 2008). Sekvence UGA plní u fytoplazem funkci stop kodónu (Bai a kol., 2006). Všechny fytoplazmy nesou unikátní sekvenci 16S rRNA genu CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT (Firrao a kol., 2004). Porovnáním genomů fytoplazem bylo zjištěno, že obsahují 14 - 23 % repetitivních oblastí, produkují nízký počet tRNA a byly u nich detekovány dvě kopie rRNA operonu.

Bylo také zjištěno, že genom fytoplazem obsahuje omezený počet genů kódujících základní metabolické dráhy. Vzhledem k tomu, že jsou fytoplazmy parazity rostlin a hmyzu, ze kterých získávají potřebné metabolity, jsou ztráty některých metabolických drah důkazem adaptace na parazitický způsob života ve výživově bohatém prostředí. Došlo například k redukci dráhy pro ATP syntasu nebo pro syntézu aminokyselin a nukleotidů. Fytoplazmy naopak oplývají velkým počtem transportních systémů, pomocí nichž získávají potřebné metabolity z hostitelů (Bai a kol., 2006; Hogenhout a kol., 2008; Kube a kol., 2008; Oshima a kol., 2004; Tran-Nguyen a kol., 2008).

3.4 Klasifikace fytoplazem

Jelikož fytoplazmy nelze kultivovat *in vitro*, byly možnosti identifikovat a klasifikovat tyto organismy dlouho omezené. Teprve s rozvojem molekulárních technik bylo možné fytoplazmy klasifikovat.

Klasifikace fytoplazem byla založena na délkovém polymorfizmu restričních fragmentů (RFLP) unikátní sekvence 16S rRNA genu. V roce 1993 byl pomocí této metody vytvořen první klasifikační systém, jenž zahrnoval 9 skupin a 14 podskupin fytoplazem (Lee a kol., 1993). Lee a kol. (1998) tento systém poté rozšířili na 14 skupin a 32 podskupin fytoplazem. Pomocí fylogenetické analýzy sekvence 16S rRNA genu byl klasifikační systém dále rozšířen na 20 skupin (Seemüller a kol., 1998).

Na základě RFLP analýzy sekvence 16S rRNA genu rozeznáváme v současnosti 28 skupin fytoplazem, přičemž každá z těchto skupin je reprezentována alespoň jedním referenčním izolátem (Wei a kol., 2007). V roce 2004 bylo jako taxonomická jednotka zastupující druh ustanoveno označení '*Candidatus phytoplasma*' spp. (Firrao a kol., 2004; Lee a kol., 1998). Pro popsání nového druhu '*Candidatus phytoplasma*' je nutné, aby sekvence 16S rRNA genu (delší než 1200 bp) daného izolátu vykazovala menší než 97,5% shodu s jakýmkoliv již popsáním druhem '*Candidatus phytoplasma*'. Nový druh může být také popsán i v případě vyšší shody, pokud se jedná o prokazatelně ekologicky odlišnou populaci. V tomto případě musí být splněny tři podmínky – fytoplazmy mají, v porovnání s jakýmkoliv jiným známým druhem fytoplazmy, odlišného hmyzího vektora, odlišného přirozeného rostlinného hostitele (nebo aspoň chování v nich) a existují průkazné molekulární rozdíly stanovené na základě DNA hybridizace, serologické reakce nebo pomocí PCR assay (Bertaccini, 2007; Firrao a kol., 2004).

Tab. 1: Systematické zařazení fytoplazem (podle Firrao a kol., 2004)

Skupina 16Sr	Název skupiny	Druh 'Candidatus Phytoplasma'
16SrI	Aster yellows	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '
16SrII	Peanut witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '
16SrIII	X-disease	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> '*
16SrIV	Coconut lethal yellows	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> '* ' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> '* ' <i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> '* ' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '
16SrV	Elm' yellows	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> '* ' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '
16SrVI	Clover proliferation	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '
16SrVII	Ash yellows	<i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '
16SrVIII	Loofah witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '*
16SrIX	Pigeon pea witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '
16SrX	Apple proliferation	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '
16SrXI	Rice yellows dwarf	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '
16SrXII	Stolbur	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '* ' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '
16SrXIII	Mexican periwinkle virescence	
16SrXIV	Bermudagrass white leaf	<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '
16SrXV	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> ' group	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '

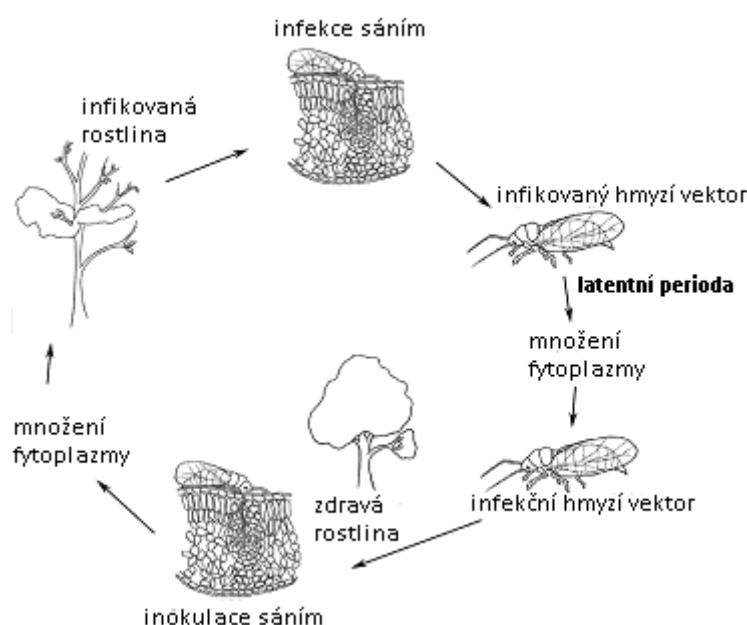
* názvy druhů fytoplazem, které nebyly dosud formálně přijaty

3.5 Způsob přenosu a šíření fytoplazem

Fytoplazmy napadají široký okruh rostlinných hostitelů, v nichž osidlují především buňky floému (Hogenhout a kol., 2008; Lee a kol., 2000). Z rostliny na rostlinu jsou fytoplazmy přenášeny hmyzími vektory, kterými jsou především mery (*Psylloidea*) a křísi (*Auchenorrhyncha*) (Weintraub a kol., 2006).

Hmyz nasává floémovou šťávu z rostliny infikované fytoplazmou (Bertaccini, 2007). Poté nastává tzv. latentní perioda, kdy se fytoplazma dostává přes stěny trávicího traktu do hemolymfy, ve které dochází k jejímu množení. Následně se fytoplazma musí dostat do slinných žláz. Teprve po uplynutí této periody může hmyzí vektor přenést fytoplazmu do dalších rostlin při sání jejich floémové šťávy (viz Obr. 1). Trvání latentní periody se může pohybovat v rozmezí 7 – 80 dní (Agrios, 1997; Murrall a kol., 1996).

Fytoplazmy mohou být také přenášeny parazitickou rostlinou kokoticí (*Cuscuta* spp.). Další možností šíření fytoplazem je vegetativní rozmnožování pomocí řízků, oddenků, hlíz nebo cibulek (Lee a kol., 2000; Marcone, 2010).



Obr. 1: Životní cyklus fytoplazem (upraveno podle Christansen a kol., 2005)

3.6 Příznaky infekce fytoplazmami

Fytoplazmy mohou v rostlinách vyvolat širokou škálu příznaků narušující vývoj rostlin. Mezi typické příznaky patří nadměrná produkce prýtlů z úžlabních pupenů – metlovitost (*witches' broom*), metamorfóza květních orgánů v listy (fylodie), vývoj zelených květů a pokles tvorby běžného květního pigmentu (virescence), žloutnutí či zčervenání listů nebo stonků, svinutky listů, prodlužování nebo zkracování internodií, celková zakrslost, chlorózy, odumírání výhonů či listů, sterilita. Intenzita a typ symptomů závisí především na druhu izolátu fytoplazmy, stádiu infekce, vnějších podmínkách nebo i hostitelské rostlině. Na hmyzí přenašeče fytoplazmy zpravidla nemají žádný vliv. Rostliny mohou být vůči fytoplazmové infekci vnímavé nebo naopak tolerantní, tzn. že nevykazují příznaky nebo vykazují velmi slabé příznaky infekce (Lee a kol., 2000; Marcone, 2010).

3.7 Ekonomický význam fytoplazem

Od roku 1967 jsou evidovány stovky chorob vyvolaných fytoplazmovou infekcí (Firrao, 2004). Fytoplazmy jsou spojovány s různými onemocněními planých i kulturních druhů rostlin. U mnoha zemědělských rostlin se fytoplazmy značně podílí na snižování výnosů a kvality úrody, čímž způsobují značné ekonomické ztráty (Lee a kol., 2000; Marzachi, 2006). V Evropě mezi ekonomicky významná onemocnění patří například evropská žloutenka peckovin (ESFY) a fytoplazma stolburu (Seemüller a kol., 2004).

3.8 Detekce fytoplazem

Dříve se k detekci fytoplazem využívaly především metody elektronové a fluorescenční mikroskopie. V současnosti je detekce fytoplazem nejčastěji prováděna metodami PCR nebo kvantitativní PCR a RFLP analýzou.

3.8.1 Elektronová mikroskopie

Pozorování v elektronovém mikroskopu byly fytoplazmy poprvé objeveny v roce 1967 (Doi a kol., 1967). Fytoplazmy lze pozorovat pomocí skenovací (SEM) nebo transmisní elektronové mikroskopie (TEM) (Lee a kol., 2000).

3.8.2 Fluorescenční mikroskopie

Tato metoda byla k detekci fytoplazem používána hlavně v minulosti pro svoji jednoduchost, nízké provozní náklady a rychlost. Při fluorescenční mikroskopii jsou zhotoveny tenké řezy (10 – 15 μm) ze stonků, kořenů nebo řepíků testovaných rostlin. Tyto řezy jsou následně barveny pomocí DNA fluorochromu DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylyndol). Bezprostředně poté jsou preparáty prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu, ve kterém je přítomnost fytoplazem detekována jako modro-bíle fluoreskující body v sítkovicích infikovaných rostlin. Touto metodou lze zjistit přítomnost fytoplazmy, ale nelze určitě její druh (Ahrens a kol., 1992).

3.8.3 PCR (polymerázová řetězová reakce)

V současné době je nejvyužívanější metodou detekce fytoplazem polymerázová řetězová reakce a to díky své vysoké citlivosti, specifčnosti a rychlosti reakce a jednoduchosti provedení. Kvůli nízkým koncentracím fytoplazem se často využívá metoda 'nested' PCR, která probíhá ve dvou krocích s použitím univerzálních i skupinově specifických primerů, které jsou odvozeny z vysoce konzervativní oblasti 16S rRNA genu. Univerzální primery jsou využívány pro detekci fytoplazem, ale jsou nevhodné pro identifikaci druhu fytoplazmy nebo při směsné infekci, v takových případech se využívá specifických primerů. V prvním kroku 'nested' PCR je provedena PCR amplifikace daného úseku DNA za použití prvního páru primerů. Získané PCR produkty jsou poté podrobeny další amplifikaci za použití druhého páru primerů. PCR amplifikace bývá často následována RFLP analýzou nebo sekvencováním (Ahrens a Seemüller, 1994; Firrao a kol., 1993).

3.8.4 Kvantitativní PCR

V posledních letech je k detekci fytoplazem často využívána i kvantitativní PCR. Pomocí této metody lze sledovat amplifikaci cílového fragmentu v jednotlivých cyklech v reálném čase pomocí fluorescenčních sond (např. TaqMan sonda) nebo fluorescenčních barviv (např. SYBR Green), které umožňují detekovat množství PCR produktu v průběhu vlastní reakce. Fluorescence je měřena v průběhu každého cyklu PCR a intenzita fluorescence je pak přímo úměrná množství amplifikované DNA přítomné v reakční směsi. Výhody této metody spočívají ve vysoké citlivosti, rychlosti a možnosti testovat velké množství vzorků (Galleto a kol., 2005; Hren a kol., 2007; Christensen a kol., 2004).

3.8.5 RFLP (Polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

RFLP analýza slouží k rozlišení jednotlivých skupin a podskupin fytoplazem. Amplifikované DNA fragmenty jsou štípány restrikčními enzymy (např. *AluI*, *HhaI*, *KpnI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, *TruI*). Restrikční produkty jsou následně separovány prostřednictvím horizontální elektroforézy v akrylamidovém nebo agarózovém gelu s příměsí ethidium bromidu (může být nahrazen fluorescenčními barvivami jako např. GelRed nebo GoldView) a následně vizualizovaný v UV světle. Porovnáním restrikčních profilů s kontrolními vzorky je poté možné identifikovat druh fytoplazmy (Lee a kol., 1998).

3.8.6 IPhyClassifier

IPhyClassifier je interaktivní nástroj, který byl vyvinut pro rychlou identifikaci a klasifikaci různých druhů fytoplazem. IPhyClassifier simuluje *in silico* laboratorní rozklady restrikčních enzymů, které jsou následně analyzovány pomocí gelové elektroforézy a v konečné fázi je vytvořen virtuální polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) profilů. Na základě modelových výsledků RFLP vypočítá koeficienty podobnosti a dává okamžité návrhy klasifikace zkoumané fytoplazmy do 16Sr skupiny a podskupiny. IPhyClassifier stanovuje také celkové procentuální skóre sekvenční podobnosti s referenčními izoláty a přiřazuje fytoplazmy v rámci studia do příslušného druhu "Ca. Phytoplasma" jako příbuzných kmenů podle zásad stanovených v Phytoplasma Taxonomy Group of the International Research Program on Comparative Mycoplasmaology. IPhyClassifier umožňuje i

vymezení potenciálně nových skupin a podskupin fytoplazem, jakož i nový druh "Ca. Phytoplasma" (Zhao a kol., 2009, 2013).

3.8.7 Sekvencování

Fytoplazmu lze identifikovat obousměrným sekvencováním oblasti 16S rRNA – 23S rRNA genu a porovnáním této sekvence pomocí databáze s identickými nebo podobnými sekvencemi. Tato metoda je náročná na přístrojové vybavení a čas, její výhodou je však přesná identifikace fytoplazem (Wei a kol., 2007).

3.8.8 Biologická detekce

V současnosti se biologická detekce provádí jen u ovocných dřevin a to jejich roubováním na biologické indikátory (Pastore a kol., 2001).

3.9 Fytoplazma stolburu

Fytoplazma stolburu je patogen způsobující závažné onemocnění u různých druhů rostlin. Fytoplazma stolburu způsobuje značné ekonomické ztráty kulturních plodin, především z čeledi lilkovitých a révy vinné, celeru, řepy cukrovky, jahodníku a levandule, při kterých dochází k snižování kvality i výnosů těchto plodin (Navrátil a kol., 2009). V případě révy vinné je tato choroba označována několika různými názvy: Bois noir (BN) ve Francii, Legno Nero (LN) v Itálii a Vergilbungskrankenheit (VK) v Německu (Langer a Maixner, 2004).

3.9.1 Taxonomie

Podle klasifikace, kterou vytvořili Lee a kol. (1998) na základě RFLP analýzy za použití restričních endonukleáz *MseI*, *RsaI* a *AluI*, patří fytoplazma stolburu do skupiny 16SrXII a podskupiny A (16SrXII-A). V roce 2007 tuto klasifikaci potvrdili i Wei a kol pomocí virtuální RFLP analýzy. Pro zástupce fytoplazmy stolburu bylo taxonomickou komisí navrženo druhové označení *Candidatus Phytoplasma solani*, jehož platnost nebyla dodnes oficiálně potvrzena (Firrao a kol., 2004; Lee a kol., 1998).

Podle klasifikace vytvořené Lee a kol. (1998) se skupina fytoplazmy stolburu 16S rDNA-XII dělí na dvě podskupiny – A a B, zatímco pozdější klasifikace podle Wei a kol. (2007) vytvořená podle počítačové simulace RFLP analýzy 16S rDNA, při níž byly použity i další restriční enzymy, jako např. *BfaI*, *EcoRI*, *HhaI*, *TaqI*, *Hinfl*, *HpaII*, *KpnI* a *Sau3AI*, rozšířila skupinu fytoplazmy stolburu 16S rDNA-XII na pět podskupin – A až E (viz Tab. 2).

Tab. 2: Rozdělení skupiny fytoplazmy stolburu (16S rDNA-XII) na podskupiny podle klasifikace Lee a kol. (1998) a Wei a kol. (2007)

Název fytoplazmy	Lee a kol. (1998)	Wei a kol. (2007)
Stolbur phytoplasma (' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ')	16SrXII – A	16SrXII – A
Grapevine yellows phytoplasma	16SrXII – A	
Celery yellows phytoplasma (CelY)	16SrXII – A	
' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	16SrXII – B	16SrXII – B
Phormium yellow leaf phytoplasma (Pyl)	16SrXII – B	
Strawberry lethal yellows phytoplasma		16SrXII – C
' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '		16SrXII – D
' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> '		16SrXII – E

3.9.3 Hostitelský okruh

Fytoplazma stolburu je patogen infikující širokou škálu kulturních i planých rostlin. Především však napadá rostliny z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) a révu vinnou (*Vitis vinifera* L.). Mezi ekonomicky významné hostitele z čeledi lilkovitých patří lilek vejcoplodý (*Solanum melongela* L.), lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.), dále paprika roční (*Capsicum annum* L.) nebo miřík celer (*Apium graveolens* L.) (Cimerman a kol., 2009; Navrátil a kol., 2009; Langer a Maixner, 2004; Sforza a kol., 1998). Hlavní rezervoárové rostliny, ze kterých je fytoplazma stolburu přenášena pomocí vektorů na jiné rostliny, jsou především svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* L.) a kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica* L.) (Langer a Maixner, 2004). Dalším hostitelem fytoplazmy stolburu může být např. cukrová řepa (*Beta vulgaris*), jahodník (*Fragaria vesca* L.) nebo levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* L.) (Cimermann a kol., 2009; Langer a Maixner, 2004).

3.9.3 Příznaky infekce

U různých hostitelských rostlin způsobuje fytoplasma stolburu různé příznaky. Na révě vinné je nejvýraznějším příznakem infekce fytoplazmou stolburu změna zbarvení listu a žilek. U bílých odrůd révy vinné dochází k předčasnému zežloutnutí, kdežto u červených odrůd dochází k zčervenání až k zfialování listů. V teplejších oblastech dochází v některých případech i ke svinování listů nebo také k nekróze zasažených částí listů. U květů révy vinné, napadených fytoplazmou stolburu, dochází k předčasnému usychání a opadu. Na plodech se infekce projevuje scvrkáváním a jejich předčasným opadem. Dalším příznakem infekce může být také dřevnatění letorostů (Hren a kol., 2009; Milkus a kol., 2005). Příznaky infekce fytoplazmy stolburu na révě vinné se mohou projevit jak jen na některých výhonech, tak i na celém keři. Na rajčatech se infekce fytoplazmou stolburu projevuje redukovanými nebo chlorotickými listy. Výhonky rajčat mohou být více vzpřímené než u zdravých rostlin. Mezi další příznaky infekce na rajčatech patří listnatění kalichu a zakrnění koruny i pohlavních orgánů. Na bramboru jsou typickými příznaky infekce fytoplazmou stolburu změny zbarvení a tvaru listů, vadnutí rostlin a povadlost a měkkost hlíz brambor. U svlačce infikované fytoplazmou stolburu se mohou projevit příznaky jako deformované a redukované květy, zelenokvětost, ztráta plazivosti, metlovitost a vznik redukovaných listů (Jović a kol., 2011, Navrátil a kol., 2009, Valenta, 1953).

3.9.4 Vektorový přenos

Hlavním vektorem přenášejícím fytoplasma stolburu je žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus* Signoret), která je především přenašečem onemocnění Bois noir, Legno Nero a Vergilbungskrankheit (Lessio a kol., 2007; Sforza a kol., 1998). Ve Francii jsou žilnatky vironosné letově nejaktivnější přibližně od poloviny června do poloviny srpna, podobná situace byla pozorována i v České republice. Dospělí jedinci žilnatka vironosná přenáší fytoplasma stolburu z plevelných rostlin, nejčastěji svlačce nebo kopřivy, kde dokončují vývoj, na révu vinnou, která je tak považována za konečného hostitele (Fialová a kol., 2009; Bressan a kol., 2006; Sforza a kol., 1999, Navrátil a kol., 2009). V roce 2010 byl v České republice potvrzen dramatický nárůst počtu zachycených jedinců na sledovaných lokalitách v zemědělsky významných oblastech na jižní Moravě (Šafářová a kol., 2011).

Dalšími potvrzenými hmyzími vektory fytoplazmy stolburu jako např. *Macrosteles quadripunctulatus*, *Anaceratagallia ribauti* (Battle a kol., 2008; Riedle-Bauer a kol., 2008), *Pentastiridius beieri*, *Reptalus panzeri* (Gatineau a kol., 2001; Jović a kol., 2007; Maixner a kol., 1995). Možnými, ale nepotvrzenými vektory, ve kterých byla fytoplazma stolburu detekována jsou například *Reptalus quinquecostatus*, *Psammotettix alienus*, *Dryodurgades reticulatus*, *Dictyophara europaea*, *Anoplotettix fuscovenosus* (Riedle-Bauer a kol., 2008; Trivellone a kol., 2005). V České republice se kromě žilnatky vironosné vyskytují i další vektorů, například *Euscelis incisus*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Macrosteles cristatus*, *Anoscopus albifrons* a *Speudotettix subfuscus*.

3.9.5 Geografické rozšíření stolburu

Častý výskyt fytoplazmy stolburu byl pozorován na území Francie, Itálie a Německa. Fytoplazma stolburu byla také identifikována na území Bulharska, Maďarska, Polska, Ukrajiny, Ruska, Chorvatska a Srbska. Dále byl její výskyt zaznamenán ve Španělsku, Švýcarsku, Číně, Japonsku a Indii (Avramov a kol., 2011; Boudon-Padieu, 2003; Chaturvedi a kol., 2010; Ember a kol., 2011; Gao a kol., 2012; Ivanović a kol., 2011; Kessler a kol., 2011; Kölber a kol., 2003; Milkus a kol., 2005; Rashidi a kol., 2010; Zwolińska a kol., 2012).

3.9.6 Genetická variabilita fytoplazmy stolburu

Fytoplazmy se mezi sebou mohou ovlivňovat díky překrývajícím se územím hmyzích vektorů a rostlinných hostitelů, v důsledku čehož můžeme mezi členy jednotlivých skupin fytoplazem pozorovat velké genetické rozdíly (Lee a kol., 1998).

Základem detekce a klasifikace fytoplazem je sekvence 16S rRNA genu, který však vykazuje nízkou genetickou variabilitu. Kvůli vysoké konzervativnosti nelze sekvenci 16S rRNA genu použít k podrobnější diferenciaci fytoplazem lišících se specifitou k vektoru nebo hostitelské rostlině. Proto byly pro spolehlivější rozlišení v rámci podskupin fytoplazem hledány jiné oblasti DNA, které by vykazovaly daleko vyšší genetickou variabilitu. Pro studium variability fytoplazmy stolburu se jako nejvýhodnější ukázaly neribozomální geny, jako jsou *map*, *secY*, *tuf* a *vmp1* (Cimerman a kol., 2009; Pacifico a kol., 2007; Schneider a kol., 1997).

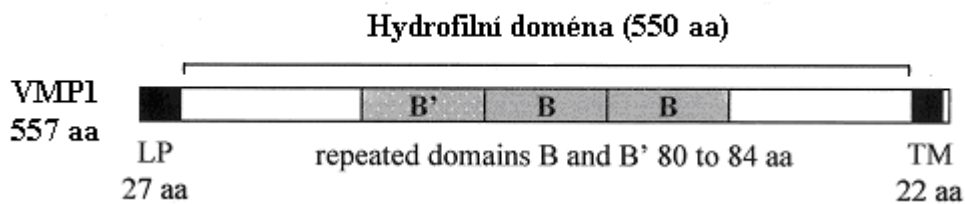
3.9.6.1 Genetická variabilita *stamp* genu

Stamp gen kóduje antigenní povrchový membránový protein o 157 aminokyselinách s hydrofobním C-terminální koncem. Při expresi *stamp* genu v *Escherichia coli* je produkován peptid o molekulové hmotnosti 16 kDa. *Stamp* gen je ze 26 % - 40 % shodný s AMP (antigenní membránový protein) '*Ca. Phytoplasma asteris*' a ze 40 % shodný s AMP '*Ca. Phytoplasma japonicum*'. Hlavní roli u fytoplazem má *stamp* gen při interakci s hmyzími vektory, u kterých ovlivňuje buňky mikrofilament a podílí se tak na interakci vektora a hostitelské rostliny (Fabre a kol., 2010, 2011).

Genetická variabilita *stamp* genu byla hodnocena u fytoplazmy stolburu v porovnání s geny *secY* a *tuf*. Pro porovnání variability genu *stamp* a *secY* byly oba geny podrobeny PCR amplifikaci u souboru izolátů fytoplazmy stolburu. Izoláty pocházely z Francie, Itálie, Německa, Maďarska, Bulharska, Chorvatska, Řecka, Srbska, Libanonu a Ázerbájdžánu. Následně byla provedena fylogenetická analýza. *Stamp* gen byl více variabilní než *secY* gen. Variabilita *stamp* genu byla charakterizována množstvím nesynonymních mutací. Poměr mezi synonymní a nesynonymní mutací byl pro *stamp* gen 2,78 a pro *secY* gen 0,64. To znamená, že *stamp* gen je podroben pozitivní diverzifikaci selekčním tlakem. Pokud jde o zeměpisný původ izolátů a *stamp* sekvence, byla většina francouzských, italských a chorvatských izolátů přiřazena ke stejné fylogenetické větvi. Druhá větev fylogenetického stromu odpovídala izolátům z Německa, Maďarska a Bulharska, zatímco třetí větev odpovídala izolátům z Řecka, Srbska, Libanonu a Ázerbájdžánu. Při porovnání s *tuf* genem bylo zjištěno, že všechny izoláty odpovídají typu *tuf-b* a byly v tomto případě přiřazeny k jedné monofyletické větvi (Fabre a kol., 2010, 2011).

3.9.6.2 Genetická variabilita *vmp1* genu

Gen *vmp1* (viz Obr. 2) kóduje povrchový membránový protein. Dříve byl tento gen nazýván *stol-1H10* (Pacifico a kol., 2007, 2009). *Vmp1* gen hraje u fytoplazem zásadní roli v molekulárních mechanismech, které řídí interakci s hmyzími vektory i rostlinnými hostiteli. V prvotní fázi životního cyklu fytoplazem *vmp1* gen napomáhá přilnutí a invazi do hostitelské buňky např. hmyzího střeva, epitelu nebo slinných žláz. Tento gen bývá také spojován se schopností interakce fytoplazmy s konkrétním hmyzím vektorem (Cimerman a kol., 2009).



Obr. 2: Struktura *vmp1* proteinu (upraveno podle Cimerman a kol., 2009)

Legenda: aa – aminokyselina; LP – terminační signál; TM – transmembránový alfa helix; B, B' - opakující se domény

Délka *vmp1* genu, který kóduje protein o 557 aminokyselinách, je 1674 bp. Tento gen je homologní ke genu kódujícímu povrchový lipoprotein VPMA *Mycoplasma agalactiae*. *Vmp1* protein je umístěn hydrofilním N-terminálním koncem v membráně fytoplazem a jeho molekulová hmotnost je 57,8 kDa. Ve srovnání s geny *map*, *secY* a *tuf*, vykazuje gen *vmp1* zřetelnou variabilitu. Z výsledků Southern blot hybridizace bylo zjištěno, že *vmp1* gen se na chromozomech fytoplazmem nachází v nejméně dvou vysoce homologních kopiích a dalších ne zcela homologních kopiích. Variabilita *vmp1* genu byla určena pomocí PCR reakce s použitím primerů Stol1H10F/Stol1H10R a TYPH10F/TYPH10R a následnou RFLP analýzou s použitím restrikčního enzymu *RsaI*. Takto bylo získáno osm restrikčních profilů s odlišnou velikostí a počtem fragmentů (Cimerman a kol., 2009).

Pacifico a kol. (2009) variabilitu *vmp1* genu potvrdili u izolátů fytoplazm pocházejících z révy vinné, svlačce, kopřivy a vektora žilnatky vironosné, které byly původem z Francie a Itálie. *Vmp1* gen byl podroben 'nested' PCR reakci s použitím specifických primerů H10F1/H10R1 a H10F2/H10R2 a byly získány produkty tří různých velikostí (1570 bp, 1820 bp, 2070 bp). Tyto produkty byly při následné RFLP analýze s použitím restrikčních enzymů *RsaI* a *AluI* rozděleny do dvanácti odlišných profilů, V1 až V12. Ve vzorcích révy vinné z Francie bylo detekováno sedm různých restrikčních profilů, a převažující byl profil V1. Ve vzorcích révy vinné z Itálie bylo detekováno devět různých profilů a nejčastěji zastoupeným byl profil V3. Tento profil V3 byl také detekován u kopřiv a u 98 % hmyzích vektorů žilnatky vironosné z Itálie. V izolátech svlačce byly identifikovány čtyři profily a nejčastěji se vyskytoval profil V12. Tesstori a kol. (2009) studovali variabilitu na révě vinné v Sicílii. Získané restrikční profily odpovídaly převážně profilu V1. Potvrdili tak zjištění Pacifica a kol. (2009), že u izolátů révy vinné se vyskytuje převážně profil V1.

Fialová a kol. (2009) studovali genetickou variabilitu *vmpI* genu v širokém spektru rostlinných hostitelů v omezené zeměpisné oblasti České republiky. RFLP analýza odhalila variabilitu restričních fragmentů pro pět různých profilů (I-V), přičemž profil I byl nejčastěji zastoupený.

3.9.6.2 Genetická variability dalších genů

Tuf gen kóduje elongační faktor Tu (EF-Tu), jenž hraje hlavní roli při translačních procesech. Poprvé byl *tuf* gen amplifikován při analýze fytoplazem skupin žloutenky astry, stolburu, proliferace jabloně, žloutenky jilmu, X-disease a žloutenky jasanu. Při amplifikaci tohoto genu pomocí primerů fTufAy/rTufAy bylo prokázáno, že fytoplazmy ze skupin žloutenky aster a stolburu jsou nejbližší příbuzné, a při analýze získaných sekvencí dále také to, že *tuf* gen je více variabilní než 16S rDNA, a proto je vhodný pro rozlišení fytoplazem, které je těžké rozlišit na základě 16S rDNA (Schneider a kol., 1997). Genetickou variabilitu fytoplazmy stolburu 'Vergilbungskrankheit' (VK) v Německu v rámci *tuf* genu studovali Langer a Maixner (2004). Vzorky pocházely z infikované révy vinné, svlačce, kopřivy a z vektoru *Hyalosthesis obsoletus*. Pomocí enzym / RFLP analýzy byly rozlišeny tři VK genotypy - VK-I, II a III. Nejrozšířenější je genotyp VK-II, který byl detekován na révě vinné, vektoru *Hyalosthesis obsoletus* a svlačci. Genotyp *tuf-a* je naopak považován za charakteristický pro fytoplazmu stolburu s kopřivou jako hostitelskou rostlinou. Fialová a kol. (2009) však detekovala i typ VK-II nejen na svlačci, ale i u kopřivy.

SecY gen kóduje podjednotku proteinu translokázy. Sekvence *secY* genu je dlouhá 1239 bp, která kóduje protein o 413 aminokyselinách a jeho molekulová hmotnost je 45,9 kDa. Tento gen je všudypřítomný mezi živými organismy, *secY* homology byly identifikovány u bakterií, archeí i eukaryot. *SecY* gen je důležitým proteinem translokace bílkovin a je součástí tzv. *Sec* systému, který je nezbytný pro buněčnou životaschopnost (Kakizawa a kol., 2001). Šeruga Music a kol. (2011) na základě porovnání fylogenetické analýzy *secY* genu a RFLP analýzy *tuf-b* genu považuje *secY* gen za variabilnější než *tuf-b*. Cimermann a kol (2009) ale přesto považuje za nejvariabilnější *vmpI* gen.

3.9.7 Fytoplazma stolburu v České republice

Patrně první výskyt fytoplazmy byl zaznamenán v roce 1933, kdy byla popsána nezvyklá mozaika vyskytující se na rajčatech v okolí Břeclavi (Valenta, 1953). V České republice je fytoplazma stolburu dlouho známou chorobou, místní epidemie a vektorový přenos byly velmi intenzivně studovány v 50. a 60. letech minulého století. Do 90. let minulého století pak nebyl zaznamenán žádný výskyt fytoplazmy, což bylo zřejmě způsobeno používáním herbicidů a insekticidů. V roce 2003 bylo zaznamenáno hlavní ohnisko fytoplazmy stolburu na jižní Moravě a pozorováno její pomalé šíření (Fialová a kol., 2009, Navrátil a kol., 2008). Současný stav rozšíření fytoplazmy stolburu v českých a moravských vinicích byl sledován v letech 2005-2011. Ve vinařské oblasti Morava byly příznaky Bois noir pozorovány ve vinicích ve všech podoblastech. Oproti tomu ve vinařské oblasti Čechy byl výskyt této choroby detekován jen sporadicky (Starý a kol., 2013).

Fialová a kol. (2009) jako první studovali genetickou variabilitu fytoplazmy stolburu v rámci jednoho regionu. Použité izoláty fytoplazmy stolburu pocházely z příznakových rostlin (réva vinná, miřík celer, rajče, brambor, paprika, svlačec rolní, pcháč oset, laskavec ohnutý, kopřiva dvoudomá, opletník polník) z okolí Lednice, Perné a Březi na jižní Moravě. Pro zjištění genetické variability izolátů byly použity neribozomální geny *vmp1*, *tuf*. U *vmp1* genu byla zaznamenána vyšší variabilita. *Vmp1* gen byl podroben 'nested' PCR s použitím primerů StolH10F1/ StolH10R1 a TYPH10F/ TYPH10R. Následně byla provedena RFLP analýza s použitím restrikčních enzymů *RsaI*, přičemž bylo získáno pět rozdílných profilů, označených I až V. Nejčastěji zastoupený byl profil I, který byl přítomen u sedmi z jedenácti hostitelských rostlin z okolí Lednice. Profily II, III a V byly nalezeny pouze v Lednici, zatímco profil IV byl nalezen na révě vinné a kopřivě dvoudomé z Březi. V této studii byl dále *tuf* gen podroben 'nested' PCR s použitím primerů Tuf1f/ Tuf1r a TufAyf/TufAyr, kterou následovala RFLP analýza s použitím restrikčního enzymu *HpaII*, přičemž bylo zjištěno, že všechny vzorky odpovídají profilu *tuf-b*. V neposlední řadě byla provedena fylogenetická analýza *secY* genu. Sekvence *secY* genu byly stanoveny z deseti vzorků z Lednice, Perné a Březi, jakož i pro pět referenčních izolátů množených roubováním. Zatímco referenční vzorky poskytly pět různých *secY* sekvencí, české vzorky poskytly pouze dva typy sekvencí. Jeden vzorek z Březi, dva vzorky z Perné a tři vzorky z Lednice měly *secY* sekvenci stejnou jako referenční izolát z Francie a tři vzorky z Březi měly *secY* sekvenci stejnou jako referenční izolát z Německa.

4. Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

K určení molekulární variability populací fytoplazmy stolburu bylo vybráno pět vzorků, ve kterých byla již dříve detekována přítomnost fytoplazmy stolburu. Jednalo se o vzorek DNA izolované z révy vinné (*Vitis vinifera* L.) a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis* L.) původem z lokality Perná, rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), pcháče rolního (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) a vektora žilnatky vironosné (*Hyalesthes obsoletus* Signoret) z lokality Lednice. Tyto vzorky byly odebrány a DNA byla izolována pracovníky laboratoře molekulární biologie mikroorganismů, Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UP.

4.2 PCR amplifikace cílových genů

U vybraných vzorků byla studována variabilita populací fytoplazmy stolburu prostřednictvím genů *stamp* a *vmp1*. Přítomnost fytoplazmy stolburu byla detekována pomocí metody 'nested' PCR s univerzálními primery, amplifikujícími 16S rRNA gen. 'Nested' PCR probíhala ve dvou krocích. V prvním kroku 'nested' byla nejprve připravena reakční směs navýšená s ohledem na počet amplifikovaných vzorků. Do 1,5 ml zkumavky byly napipetovány její jednotlivé složky (viz Tab. 4), s použitím primerů StampF/StampR0 (viz Tab. 3) pro amplifikaci *stamp* genu a nebo StolH10F1/StolH10R1 (viz Tab. 3) pro amplifikaci *vmp1* genu. Reakční směs pro PCR amplifikaci byla připravena na ledu ve sterilním boxu. Reakční směs byla po 22 μ l rozpipetována do PCR mikrozkuvek o objemu 0,2 ml a k ní byly následně přidány 2 μ l (cca 100 ng) vyizolované DNA. Poté byly vzorky protřepány vortexováním, stočeny ve stolní centrifuze a vloženy do termocycleru, v němž následně proběhla PCR reakce za specifických podmínek (viz Tab. 5, 6).

V druhém kroku byla obdobně jako v prvním kroku připravena reakční směs pro PCR amplifikaci (složení viz Tab. 4) s použitím primerů StampF1/StampR1 (viz. Tab. 3) pro amplifikaci *stamp* genu anebo TYPH10F/TYPH10R (viz Tab. 3) pro amplifikaci *vmp1* genu. Do této reakční směsi byly přidány 3 μ l 20krát ředěného PCR produktu z prvního kroku 'nested' PCR a byla provedena PCR amplifikace za specifických podmínek (viz Tab. 5, 7).

Tab. 3: Sekvence primerů použitých pro 'nested' PCR

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Velikost PCR produktu	Reference
<i>Stamp</i> gen			
StampF	GTAGGTTTTGGATGTTTTAAG	637 bp	Fabre a kol., 2010
StampR0	AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA		
StampF1	TTCTTTAAACACACCAAGAC	578 bp	
StampR1	AAGCCAGAATTTAATCTAGC		
<i>Vmpl</i> gen			
StoIH10F1	AGGTTGTAAAATCTTTTATGT	1,7 kb	Cimerman a kol., 2009
StoIH10R1	GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC		
TYPH10F	AACGTTTCATCAACAATCAGTC	1,4 kb	Fialová a kol., 2009
TYPH10R	CACTTCTTTCAGGCAACTTC		

Tab. 4: Složení reakční směsi pro PCR reakci

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Množství na reakci
PCR pufr	10x	2,50 µl
MgCl ₂	50 mM	0,75 µl
Voda		16,50 µl
dNTP (Fermentas)	2 mM	1,25 µl
F primer	20 pmol/ul	0,25 µl
R primer	20 pmol/ul	0,25 µl
Platinum Taq DNA polymerasa (Invitrogen)	5 U/ml	0,50 µl
Objem reakční směsi		22 µl
Objem vzorku		3 µl
Celkový objem reakce		25 µl

Tab. 5: Podmínky 'nested' PCR pro primery StampF/StampR0 a StampF1/StampR1 (Fabre a kol., 2010)

Teplota	Doba	Počet cyklů
94 °C	4 min	1
94 °C	30 s	35
56 °C	30 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	7 min	1

Tab. 6: Podmínky 'nested' PCR pro primery StolH10F1 / StolH10R1 (Fialová a kol., 2009)

Teplota	Doba	Počet cyklů
94 °C	4 min	1
94 °C	30 s	35
52 °C	30 s	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1

Tab. 7: Podmínky 'nested' PCR pro primery TYPH10F/TYPH10R (Fialová a kol., 2009)

Teplota	Doba	Počet cyklů
94 °C	4 min	1
94 °C	30 s	35
55 °C	30 s	
72 °C	1 min 30 s	
72 °C	5 min	1

4.3 Detekce PCR produktu

Úspěšnost PCR amplifikace byla vyhodnocena elektroforetickou separací v 1% agarózovém TAE gelu. Jeho zásobní roztok byl připraven smícháním a následným rozehrátím 3 g agarózy (Agarose I, AmrescoR) s 300 ml TAE (1x) pufru v mikrovlnné troubě.

Z připraveného zásobního roztoku agarózového gelu bylo odebráno 50 ml gelu, do kterého bylo přidáno 2 µl barviva GoldView (SBS, Beijing, China). Po promíchání byl gel nalit do elektroforetické vaničky a ponechán tuhnout cca 45 min. Poté byl gel umístěn do elektroforetické komory a přelit 1x TAE pufrem.

Do první jamky gelu byl nanesen standard molekulové váhy (Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas) o objemu 2 µl. Do dalších jamek bylo nanášeno 5 µl PCR produktu smíchaného se 2 µl 6x Loading dye (Promega). Elektroforetická separace probíhala asi 30-45 min při stejnosměrném napětí 80 V. Po ukončení elektroforetické separace byl gel vyhodnocen pomocí UV transluminátoru a dokumentován pomocí dokumentačního systému GeneSnap (Syngene).

4.4 Izolace PCR produktu z gelu

Izolace PCR produktu byla provedena pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit podle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Z výsledků PCR reakce po elektroforéze byly vybrány pozitivní vzorky. Ty byly podrobeny elektroforéze v 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu, kdy do 75 μ l gelu bylo přidáno 6 μ l ethidium bromidu (10 mg/ml). Elektroforéza probíhala při stejnosměrném napětí 80 V po dobu cca 45 min. Poté byl 1% agarózový gel umístěn na UV transluminátor a sterilním skalpelem byly za procházejícího UV světla vyříznuty oblasti obsahující PCR produkt. Každá vyříznutá oblast byla přenesena do předem zvážených 1,5 ml mikrozkušavek a byla zjištěna jejich hmotnost. Do zkumavek byl přidán QG pufr v trojnásobném množství váhy gelu (100 mg gelu \sim 100 μ l pufru). Následně byly zkumavky inkubovány 10 min při 50 °C v dry-bloku, dokud se gel kompletně nerozpustil. Pro lepší rozpuštění gelu byly zkumavky během inkubace vortexovány v intervalu 2-3 min. Po kompletním rozpuštění gelu byl přidán jeden objem izopropanol (100 mg gelu \sim 100 μ l pufru). QIAquick kolonky pro izolaci byly vloženy do sběrných zkumavek a celý objem každé směsi byl do této kolonky napipetován. Kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Proteklý obsah ve sběrných zkumavkách byl vylit a kolonka byla vrácena do sběrných zkumavek. Na kolonky bylo napipetováno 500 μ l QG pufru. Kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Proteklý obsah ve sběrných zkumavkách byl vylit a kolonka byla vrácena do sběrných zkumavek. Na kolonky bylo napipetováno 750 μ l PE pufru. Kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Proteklý obsah ve sběrných zkumavkách byl vylit, kolonka byla vrácena do sběrných zkumavek a kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm naprázdno. Následně byly kolonky přemístěny do čistých 1,5 ml zkumavek. Pro uvolnění DNA z kolonek bylo na střed kolonek napipetováno 50 μ l destilované vody. Kolonky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm. Vyizolovaná DNA byla dlouhodobě uchovávána při -20 °C a dále byla použita v dalších analýzách.

4.5 Klonování PCR produktu

4.5.1 Ligace DNA do plazmidu

Vyizolovaný PCR produkt byl ligován do pGem-T plazmidu pomocí pGEM-T Vector System kitu (Promega, USA) podle modifikovaného protokolu výrobce.

Ligační směs byla připravena do 0,2 ml mikrozkušavky, do které bylo napipetováno 5 μ l ligačního pufru, 3 μ l vyizolovaného PCR produktu, 1 μ l pGem-T plazmidu a 1 μ l T4 DNA ligázy. Ligační směs byla promíchána špičkou a stočena. Ligace probíhala při 4 °C přes noc.

4.5.2 Transformace bakterií *E.coli*

Rekombinantního plazmid pGem-T byl vložen do kompetentních bakterií *E. coli* kmenu DH5 α . Transformace proběhla teplotním šokem.

Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu. Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 75 μ l kompetentních buněk a 5 μ l ligační směsi. Celá směs byla inkubována na ledu 20 min. Následně proběhla transformace pomocí teplotního šoku při 42 °C po dobu 45 s a ihned poté byly buňky přeneseny zpět na led, kde byly ponechány minimálně 2 min. K buňkám bylo přidáno 850 μ l živného SOC média a směs byla inkubována na překlápěcí třepačce 1,5 h při 37 °C. Po skončení kultivace byly bakterie sedimentovány centrifugací při 6000 rpm po dobu 3 min. Z mikrozkušavek bylo odstraněno 850 μ l supernatantu a pelet byl rozsuspendován ve zbytku kultivačního média. Následně byla suspenze sterilní kličkou rozetřena na povrch LB média s přídavkem ampicilinu (100 μ g ampicilinu na 1 ml LB média), na jehož povrch bylo předem rozetřeno 40 μ l X-Gal a 4 μ l IPTG. Petriho misky s vysetou bakteriální suspenzí byly zabaleny do alobalu a obrácené dnem vzhůru inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den byly narostlé kolonie vyhodnoceny a potencionálně pozitivní (bílé) bakteriální kolonie byly pomocí sterilních párátek přeinkulovány na nové LB médium s ampicilinem. Bakterie byly poté inkubovány přes noc při 37 °C.

4.5.3 Skrining pozitivních kolonií pomocí PCR

Přítomnost transgenu byla v potencionálně pozitivních (bílých) koloniích testována pomocí PCR amplifikace s použitím primerů M13f/M13r (viz Tab. 8), podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tab. 10. Pro každý vzorek bylo připraveno 20 µl reakční směsi (složení viz Tab. 9), do které byly sterilním párátkem přeneseny transformované bakterie jednotlivých kolonií. Výsledek PCR reakce byl vyhodnocen elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Získané M13-PCR produkty byly použity při dalších analýzách.

Tab. 8: Sekvence primerů M13f/M13r

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Reference
M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	Invitrogen, 1999
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen, 1999

Tab. 9: Složení reakční směsi pro PCR reakci za použití primerů M13f/M13r

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Množství na reakci
PCR pufr	5x	4,00 µl
Voda		13,35 µl
dNTP	2 mM	2,00 µl
F primer	20 pmol/ul	0,20 µl
R primer	20 pmol/ul	0,20 µl
My Taq DNA polymerasa	5 U/ ul	0,25 µl

Tab. 10: Podmínky PCR reakce pro primery M13f/M13r

Teplota	Doba	Počet cyklů
95 °C	2 min	1
95 °C	1 min	35
55 °C	2 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1

4.5.4 Uchovávání transformovaných bakterií

K dlouhodobému uchovávání transformovaných bakterií pro pozdější manipulace byly z pozitivních bakteriálních kolonií vytvořeny bakteriální konzervy.

LB médium s ampicilinem (100 µg ampicilinu na 1 ml LB média) bylo rozpipetováno po 1 ml do 1,5 ml mikrokumvek. Do mikrokumavek s médiem byly přeneseny sterilním párátkem bakterie z pozitivně selektovaných kolonií. Poté byly bakteriální suspenze kultivovány na třepačce přes noc při 37 °C. Druhý den bylo z každé suspenze přeneseno 850 µl do nových sterilních 1,5 ml mikrokumavek a následně přidáno 150 µl glycerolu, směs byla promíchána. Bakteriální konzervy byly dlouhodobě uloženy v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

4.5.5 Složení a příprava pracovních roztoků

LB (LURIA-BERTANI) médium (250 ml):

<u>Složka:</u>	<u>množství:</u>
Kasein hydrolyzát	2,5 g
Kvasničný autolyzát	1,25 g
Pepton	1,25 g
NaCl	2,5g
H ₂ O	250 ml
Agar	4,5 g

LB médium je připraveno smícháním všech složek a následným autoklávováním po dobu 25 min při teplotě 120 °C.

SOC médium:

<u>Složka:</u>	<u>množství:</u>
Pepton	2,0 g
Kvasničný extrakt	0,5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	0,25 ml
2M Mg ²⁺ roztok	1 ml
2M glukóza	1 ml

2M Mg²⁺ roztok: MgCl₂.6H₂O 20,33 g
MgSO₄.7H₂O 24,65 g

Obě složky jsou smíchány a doplněny destilovanou vodou do objemu 100 ml a následně je roztok sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr (Millipore).

2M glukóza: 3,60 g glukózy je rozpuštěno v 10 ml destilované vody a následně je roztok sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr (Millipore).

Pepton, kvasničný extrakt, NaCl, KCl jsou rozpuštěny v 97 ml vody, autoklávovány po dobu 30 min při teplotě 120 °C a poté ochlazeny na pokojovou teplotu. Sterilně, ve flow boxu jsou následně přidány roztoky Mg²⁺ a glukózy, oba do finální koncentrace 20 mM. Vše je doplněno sterilní vodou na konečný objem 100 ml.

Zásobní roztok ampicilinu (100mg/ml):

1 g ampicilinu je rozpuštěn v 10 ml destilované vody a následně je roztok sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr (Millipore). Zásobní roztok ampicilinu je uchováván při -20 °C.

Zásobní roztok X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranoside (20 mg/ml):

20 mg X-Gal je rozpuštěno v 1 ml dimethylformamidu. Zásobní roztok není nutné sterilizovat, je nutné ho chránit před světlem a je uchováván při -20 °C.

Zásobní roztok IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (200 mg/ml):

2 g IPTG je rozpuštěno v 8 ml destilované vody, doplněny vodou do 10 ml a následně je roztok sterilizován filtrací přes 0,22 µm filtr (Millipore). Zásobní roztok IPTG je uchováván při -20 °C.

4.6 Sekvenační značení

Jednotlivých genů byly sekvenovány pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu (Applied Biosystems™) podle modifikovaných pokynů výrobce (viz Tab. 12, 13). Pro oboustranné sekvenační značení fragmentu genu *stamp* bylo použito 30 ng templátové DNA za použití primerů M13f a M13r. Pro oboustranné sekvenační značení

fragmentu genu *vmp1* bylo použito 60 ng templátové DNA za použití primerů M13f, M13r a 1H10R4 (viz Tab. 11). Celkem bylo sekvenačně značeno 200 vzorků genu *stamp* a 200 vzorků genu *vmp1*. Vzorky byly poté sekvenovány pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM model 3730 (PE Applied Biosystems, USA) na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci.

Tab. 11: Sekvence primeru 1H10R4

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Reference
1H10R4	AACTGCAGCTTGAGTTCTTGC	Cimerman a kol., 2009

Tab. 12: Složení reakční směsi pro sekvenční reakci

Položka	Množství na reakci
Pufř	1 μ l
BigDye	1 μ l
Primer (3,2 pmol/ μ l)	1 μ l
Vzorek DNA	30 ng (<i>stamp</i>) nebo 60 ng (<i>vmp1</i>) DNA
Voda	Doplnit do celkového objemu reakce 10 μ l

Tab. 13: Podmínky sekvenační reakce

Teplota	Doba	Počet cyklů
96 °C	1 min	1
96 °C	10 s	40
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
10 °C	10 min	1

4.7 Analýza sekvencí

Jednotlivé analyzované sekvence byly složeny pomocí programu Seqman (DNASTAR, Lasergene). Složené sekvence byly porovnávány s dostupnými sekvencemi pomocí programu Blast (BLAST, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Pomocí algoritmu Clustal v programu Mega 5.0 byly ze získaných sekvencí jednotlivých vzorků, vytvořeny mnohočetné alignmenty. Genetická variabilita izolátů a jejich fylogenetické vztahy byly následně analyzovány pomocí modelu metody neighbor-joining analýzy programu Mega 5.0, bootstrap opakování 500x. Získaný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí TreeExplorer (Mega 5.0). Alignment haplotypů byl proveden pomocí Median-joining network algoritmu, výsledné dendrogramy byly vytvořeny pomocí DrawNetwork, programu NETWORK.

4.8 *In silico* RFLP analýza

Získané sekvence *vmp1* genu byly genotypizovány pomocí restriční endonukleázy *RsaI* podle Fialová et al. (2009). V podmínkách *in silico* provedena byla RFLP analýza a získané profily byly vizualizovány za pomoci programu pDraw (AcaClone, <http://www.acaclone.com>).

4.9 Přístrojové vybavení laboratoře

Sterilní box TELSTAR PV-100, Telstar

Vortex MS1 MINISHAKER, IKAR

Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI, Labnet International, Inc.

Termocyklér PTC-100, MJ Research

Mikrovlňná trouba

Horizontalni elektroforeza, Biometra

Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Pack P 25, Biometra

UV transluminátor G:BOX, Syngene a dokumentační zařízení Syngene

UV transluminátor MACRO VUE UVis-20, Hoefler

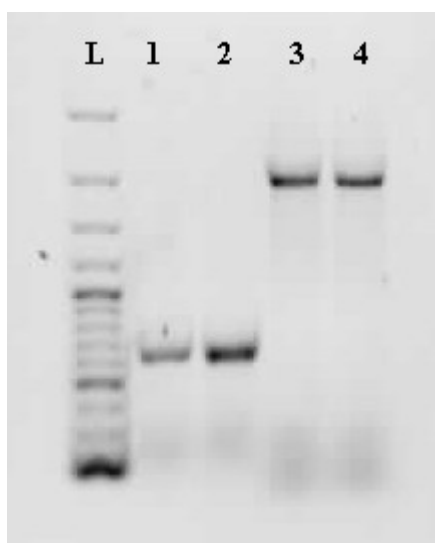
Termoblok Dry-Block DB-20, Techne

Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.

Fluorometr Hoefler DyNA Quant 200

5. Výsledky

Přítomnost fytoplazmy stolburu v pěti vybraných vzorcích pocházejících z lokalit Perná a Lednice byla detekována pomocí 'nested' PCR. Amplifikaci *stamp* genu byla provedena s použitím párů primerů StampF/StampR0 a StampF1/StampR1 a amplifikace *vmp1* genu byla provedena s použitím párů primerů StolH10F/StolH10R a TYPH10F/TYPH10R. Pomocí elektroforetické separace bylo zjištěno, že PCR produkty všech pěti vzorků *stamp* genu měly velikost cca 650 bp a v případě *vmp1* genu měly velikosti cca 1450 bp, což odpovídalo očekávané velikosti.



Obr. 3: Elektroforetogram 'nested' PCR produktů fytoplazmy stolburu (L: 100 bp plus ladder, Fermentas; dráhy 1, 2 – *stamp* gen; dráhy 3, 4 – *vmp1* gen)

Fragmenty jednotlivých genů amplifikovaných pomocí 'nested'- PCR byly úspěšně transformovány do pGEM-T plazmidu a *E. coli*. Pro každý gen, hostitelský vzorek a vektora bylo oboustranně sekvencováno 40 bakteriálních kolonií. Získané sekvence byly sestaveny pomocí programu Seqman a konečné sekvence byly porovnávány s databází GenBank.

Porovnáním se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu Blast (verze 2.2.28) (Zhang a kol., 2000) byla potvrzena předpokládaná identita, *vmp1* a *stamp* gen, získaných sekvencí. Sekvence *vmp1* genu původem izolátu 227.2 z *Hyalesthes obsoletus* a 2857 z pcháče rolního vykazovaly nejvyšší, 98% identitu s italskými izoláty stolburu "Mag1" (Acc. No. HM008613.1) a "Mir10" (Acc. No. HM008615.1) z révy vinné. Sekvence *vmp1*

genu izolátu 3745 původem ze svlačce rolního vykazovala nejvyšší, 99% identitu s italským izolátem stolburu "Aaq1" (Acc. No. HM008601.1) z révy vinné a s německým izolátem stolburu "D_Bacharach_C" (Acc. No. JQ977738.1) ze svlačce rolního. Sekvence *vmp1* genu izolátu 3849 původem z révy vinné vykazovala nejvyšší, 98% identitu s italským izolátem stolburu "Mag1" (Acc. No. HM008613.1) z révy vinné a s italským izolátem stolburu "N12" (Acc. No. JQ977732.1) z kopřivy dvoudomé.

Sekvence *stamp* genu izolátu 227.2 původem z *Hyalesthes obsoletus* vykazovala nejvyšší, 99% identitu s francouzským izolátem stolburu "19-25" (Acc. No. FN813267.1) z *Hyalesthes obsoletus* a s řeckým izolátem stolburu "GR13" (Acc. No. FN813264.1) z révy vinné. Sekvence *stamp* genu izolátu 2857 původem z pcháče rolního vykazovala nejvyšší, 98% identitu s francouzským izolátem stolburu "19-25" (Acc. No. FN813267.1) z *Hyalesthes obsoletus* a se srbským izolátem stolburu "STOL" (Acc. No. FN813261.1) z papriky roční. Sekvence *stamp* genu izolátu 3058 původem z rajčete jedlého vykazovala nejvyšší, 98% identitu s libanonským izolátem stolburu "P7" (Acc. No. FN813258.1) původem z barvínku růžového a se srbským izolátem stolburu "STOL" (Acc. No. FN813261.1) původem z papriky roční. Sekvence *stamp* genu izolátu 3745 původem ze svlačce rolního vykazovala nejvyšší, 99% identitu s francouzským izolátem stolburu "L646" (Acc. No. FN813265.1) z levandule lékařské a s bulharským izolátem stolburu "BG4560" (Acc. No. FN813252.1) z révy vinné. Sekvence *stamp* genu izolátu 3849 původem z révy vinné vykazovala nejvyšší, 100% identitu s německým izolátem stolburu "GGY" (Acc. No. FN813256.1) z révy vinné a s německým izolátem stolburu "S1" (Acc. No. JQ977713.1.1) z kopřivy dvoudomé.

Na základě *in silico* *RsaI*/RFLP analýzy byla u izolátů fytoplazmy stolburu provedena genotypizace a zařazení do *vmp1* profilů. Všechny izoláty fytoplazmy stolburu získané z pcháče rolního, révy vinné a žilnatky vironosné vykázaly profil příslušející do skupiny I (podle Fialová a kol., 2009) respektive V2 (podle Pacifico a kol., 2009). Izoláty získané z infikovaného svlačce vykazovaly podobnost s profilem skupiny V (V4) (viz Obr. 4).



Obr. 4: *RsaI* / RFLP profily získaných typových izolátů fytoplazmy stolburu

(MW – marker molekulové hmotnosti, GeneRuler 100bp DNA ladder, Fermentas; I - *vmp1* profil (V2), V – *vmp1* profil V (V4))

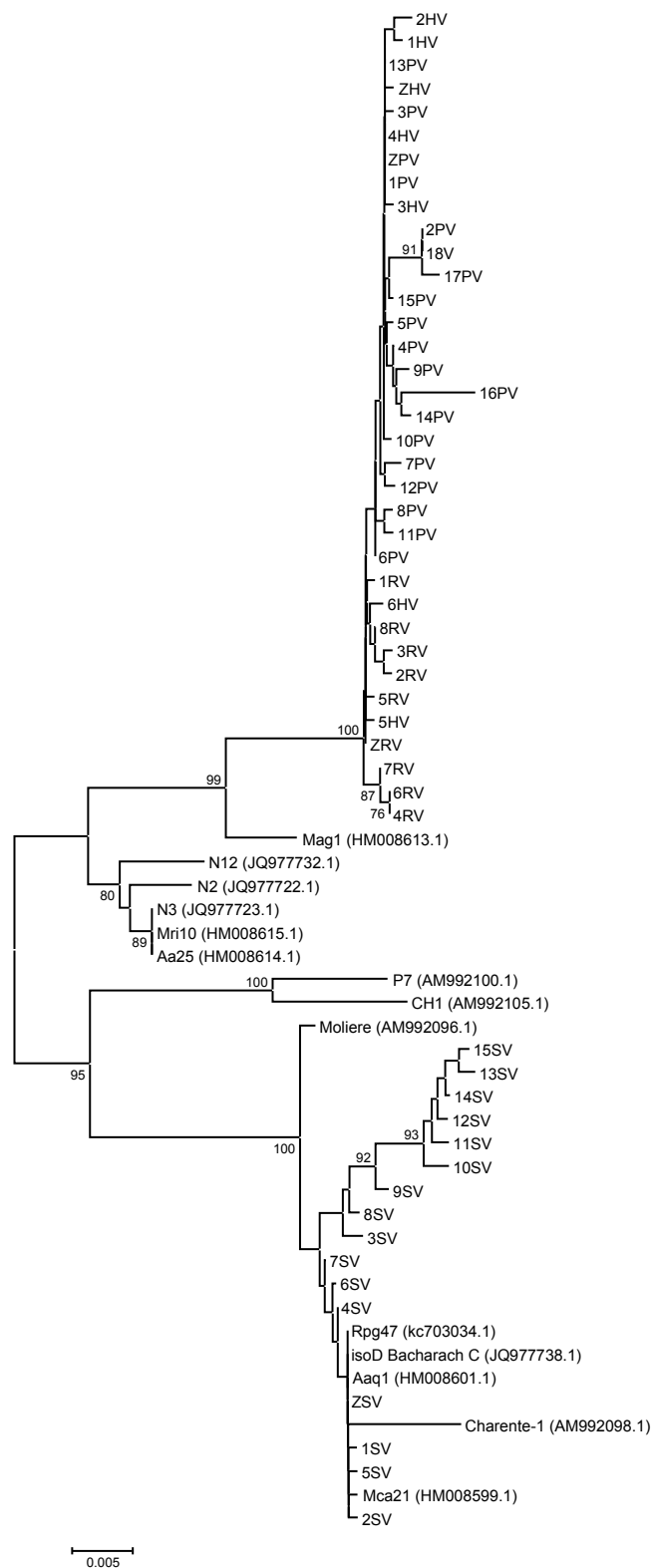
U izolátů fytoplazmy stolburu byly studovány také fylogenetické vztahy. U izolátů *vmp1* genu byla zaznamenána variabilita související s jejich zjištěným genotypovým profilem. Izoláty se rozdělily do dvou větví. Většina izolátů, haplotypů, vytvořila samostatnou větev, obsahující izoláty pocházející z *Hyalesthes obsoletus*, révy vinné a pcháče rolního, průkazně odlišnou od ostatních izolátů. Tyto sekvence vykazovaly nejbližší fylogenetickou příbuznost s italským izolátem Mag1 původem z révy vinné. Druhou nejbližší příbuznou skupinu pak vytvořily izoláty Mir10, N12 (Ac. No. JQ977732.1) a N2 (Ac. No. JQ977722j.1) původem z kopřivy dvoudomé z Německa a N3 (Ac. No. JQ977723.1) z kopřivy dvoudomé ze Slovenska, Aa25 (Ac. No. HM008614.1) původem z révy vinné z Itálie. Izoláty pocházející ze svlačce vytvořily společně s francouzskými izoláty Molière původem z třešně obecné a Charante-1 (Ac. No. AM992096.1) původem z žilnatky vironosné, německým izolátem D_Bacharach_C ze svlačce rolního, Rpg47 (Ac. No. KC703034.1) z *Reptalus panzeri* ze Srbska, Mca21 (Ac. No. HM008599.1) a Aaq1 původem z révy vinné z Itálie, statisticky průkaznou druhou větev. Tyto izoláty se navíc vyvětvily do dvou samostatných klastrů s průkazností větvení bootstrap 92%. K nim nejbližší příbuznou skupinu pak vytvořily izoláty P7 (Ac. No. AM992100.1) původem z barvínku růžového z Libanonu, a CH1 (Ac. No. AM992105.1) původem z révy vinné z Itálie (viz Obr. 5).

Z této fylogenetické analýzy vyplývá, že izoláty pocházející z pcháče rolního a žilnatky vironosné z lokality Lednice a izoláty pocházející z révy vinné z lokality Perná vykazují vysokou příbuznost bez ohledu na jejich odlišný původ.

U izolátů *stamp* genu byla zaznamenána variabilita související s jejich zjištěným genotypovým profilem. Izoláty se rozdělily do tří větví. Izoláty původem z pcháče rolního společně s německým izolátem GGY, se srbským izolátem Vv5 (Ac. No. KC703021.1), s bulharským izolátem BG4650, všechny z révy vinné, a izoláty ZSS a 2SS ze svlačce rolního, vytvořily první větev. Tato větev vykazovala nejbližší fylogenetickou příbuznost s francouzským izolátem L646 původem z levandule lékařské. Německé izoláty 19-25 z révy vinné, E (Ac. No. FN813263.1) a S1 (Ac. No. JQ977713.1) z kopřivy dvoudomé, GR13 původem z révy vinné z Řecka, S6 (Ac. No. JQ977718.1) původem z kopřivy dvoudomé z Itálie společně s izoláty ZHS, 1HS původem z žilnatky vironosné a izoláty ZRS, 1RS, 2RS, 3RS původem z révy vinné, vytvořily druhou větev. Nejpříbuznější k nim je slovenský izolát OSESLO2 (Ac. No. FN813269.1) z kopřivy dvoudomé. Třetí větev vytvořily studované izoláty původem z rajčete jedlého a izolát 1SS ze svlačce rolního. Tato větev vykazovala nejbližší příbuznost se skupinou izolátů STOL původem z papriky roční ze Srbska, P7 původem z barvínku růžového z Libanonu (viz Obr. 6).

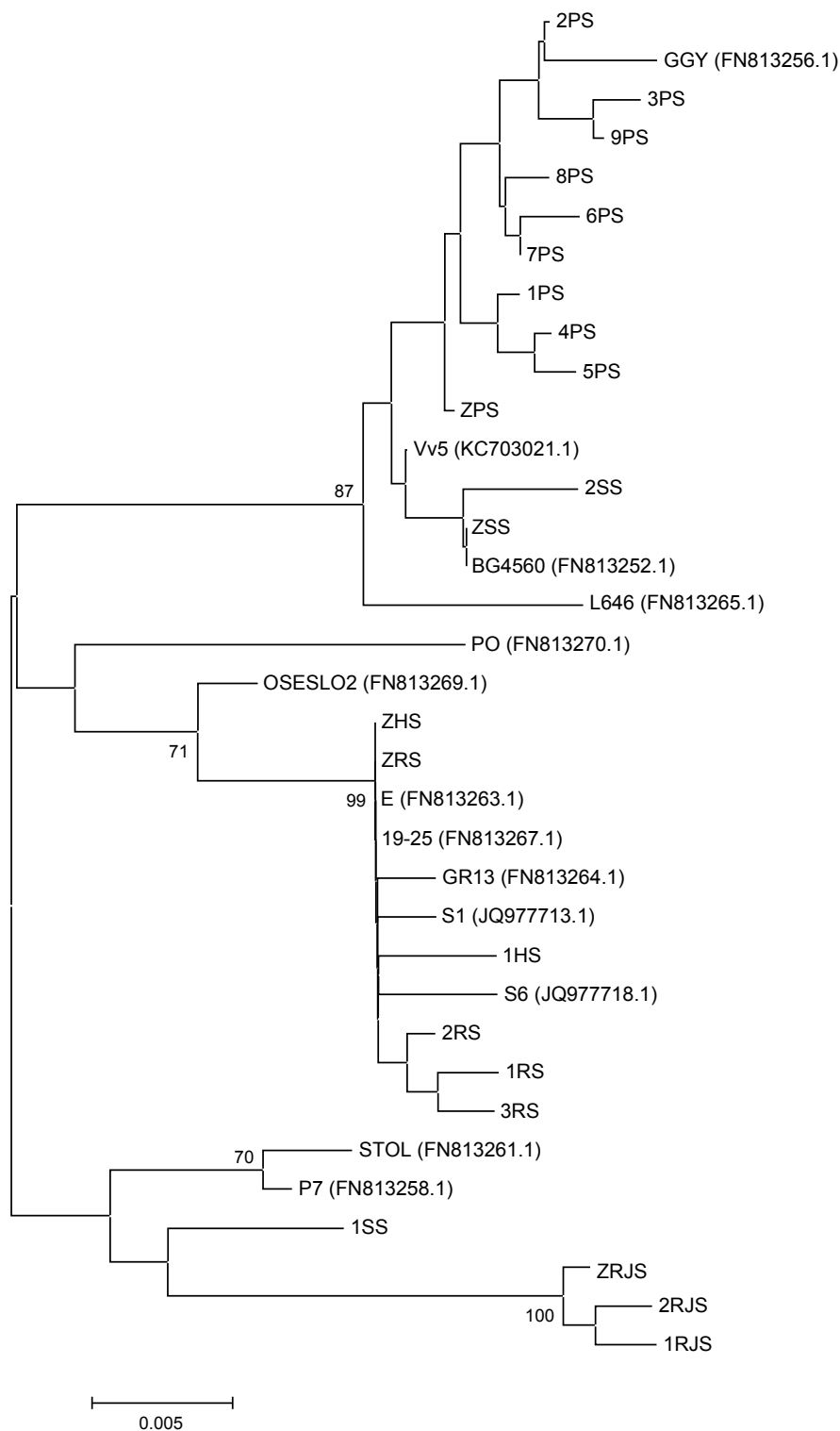
Z této fylogenetické analýzy vyplývá, že mezi analyzovanými izoláty vykazují nejvyšší příbuznost izoláty pocházejícími z pcháče rolního z lokality Lednice a svlačce rolního z lokality Perná, obdobně pak izoláty pocházející z révy vinné z lokality Perná a žilnatky vironosné z lokality Lednice, a také pocházející z rajčete jedlého původem z lokality Lednice a izolát 1SS pocházející ze svlačce rolního z lokality Perná, bez ohledu na jejich odlišný mikro-geografický a hostitelský původ.

Ze získaných sekvencí byly v rámci každého vzorku vytvořeny jednotlivé mnohočetné alignmenty, na jejichž základě byla určena přítomnost a frekvence synonymních či nesynonymních mutací a variabilita jednotlivých populací.



Obr. 5: Dendrogram izolátů fytoplazmy stolburu sestavený na základě *vmpI* genu pomocí neighbor-joining analýzy, ClustalW.

(Jednotlivé položky jsou označeny názvem izolátu a Genbank Ac. No. (v závorce), úsečka znázorňuje procento nukleotidových substitucí, znázorněny hodnoty bootstrap ≥ 70).



Obr. 6: Dendrogram izolátů fytoplazmy stolburu sestavený na základě *stamp* genu pomocí neighbor-joining analýzy, ClustalW.

(Jednotlivé položky jsou označeny názvem izolátu a Genbank Ac. No. (v závorce), úsečka znázorňuje procento nukleotidových substitucí, znázorněny hodnoty bootstrap ≥ 70)

V genu *vmp1* izolátů 227.2 byla nejčtenější záměna A981G, která se vyskytla u 20 % analyzované populace. Méně časté byly záměny A347G, C620G a G1405A u 10 % populace. Nejméně časté byly záměny G307A a T703C u 5 % populace. Celkem bylo u izolátu 227.2 zjištěno 27 mutací, z nichž 7,4 % tvořily synonymní mutace a 92,6 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 14). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 227.2 byla identifikována přítomnost 7 haplotypů, nejčastěji zaznamenanými byl haplotyp základní (ZHV) a to v 60 % případech (viz Obr. 7).

V genu *vmp1* izolátů 2857 byly nejčtenějšími záměnami G113A, G801A a T881A, které se vyskytly u 25 % analyzované populace. Ve vyšší míře se vyskytovaly záměny T88G u 22,5 % populace a T70C u 20 % populace. Méně časté byly záměny A976G a C1317T u 15 % populace, T261C, T529A a A578G u 10% populace. Nejméně časté záměny byly T133C a T430C u 7,5 % populace. Celkem bylo u izolátu 2857 zjištěno 82 mutací, z nichž 36,6 % tvořily synonymní mutace a 63,4 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 14). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 2857 byla identifikována přítomnost 19 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZPV), a to v 17,5 % případech (viz Obr. 8).

V genu *vmp1* izolátů 3745 byla nejčtenější záměnou T558A, která se vyskytla ve 32,5 % analyzované populace. Dalšími častými záměnami byly G755T, G763A a T791G u 30 % populace, T676A u 27,5 % populace, G679C u 25 % T/G populace, T601C, G616A, T804C u 20 % populace a G594A, T958, G603C, C619T, A818G, G821A, T870C, A1268G u 17,5 % populace. Méně časté byly záměny C569T, G749T, C750G u 15% populace a G540T, A716G u 12,5 % populace. Nejméně časté byly záměny A242C a G525C u 10% populace. Celkem bylo u izolátu 3745 zjištěno 186 mutací, z nichž 20,9 % tvořily synonymní mutace a 79,1 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 14). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 3745 byla identifikována přítomnost 16 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZSV) a to v 40 % případech (viz Obr. 9).

V genu *vmp1* izolátů 3849 byla nejčtenější záměnou G613A a G1211A, které se vyskytly u 25 % analyzované populace. Méně časté byly záměny A1133G u 12,5 % populace a C618G, C690G u 10 % populace. Nejméně častou byla záměna T813C u 7,5 % populace. Celkem bylo u izolátu 3849 zjištěno 36 mutací, z nichž 11,1 % tvořily synonymní mutace a 88,9 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 14). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 3849 byla identifikována přítomnost 9 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZSV) a to v 45 % případech (viz Obr. 10).

Obr. 7: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 227.2, *vmp1* gen (u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1HV:	981 A/G	1405 G/A	- 4x
2HV:	347 A/G	981 A/G	- 4x
3HV:	620 C/G		- 3x
4HV:	307 A/G	703 T/C	- 2x
5HV:	899 G/A		- 2x
6HV:	620 C/G	899 G/A	- 1x

Obr. 8: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 2857, *vmp1* gen (u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1PV:	70 T/C	88 T/G	113 G/A	801 G/A		- 4x
2PV:	70 T/C	88 T/G	113 G/A	801 G/A	1317 C/T	- 4x
3PV:	431 T/C					- 3x
4PV:	881 T/A					- 3x
5PV:	261 T/C					- 2x
6PV:	806 G/A					- 2x
7PV:	881 T/A	976 A/G				- 2x
8PV:	133 T/C	578 A/G	806 G/A			- 2x
9PV:	529 T/A	881 T/A	976 A/G			- 2x
10PV:	133 T/C					- 1x
11PV:	578 A/G					- 1x
12PV:	976 A/G					- 1x
13PV:	1317 C/T					- 1x
14PV:	261 T/C	881 T/A				- 1x
15PV:	529 T/A	881 T/A				- 1x
16PV:	261 T/C	881 T/A	976 A/G			- 1x
17PV:	113 G/A	529 T/A	801 G/A			- 1x
18PV:	88 T/G	113 G/A	801 G/A	1317 C/T		- 1x

Obr. 9: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 3745, *vmpI* gen (u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1SV:	1268 A/G																				- 6x	
2SV:	242 A/C																					- 3x
3SV:	558 T/A	755 G/T	763 G/A																			- 3x
4SV:	558 T/A																					- 1x
5SV:	601 T/C																					- 1x
6SV:	676 T/A																					- 1x
7SV:	676 T/A	679 G/C																				- 1x
8SV:	558 T/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C	755 G/T	763 G/A																- 1x
9SV:	558 T/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C	716 A/G	755 G/T	763 G/A	791 T/G														
	804 T/C	818 A/G	821 G/A	870 T/C																		- 1x
10SV:	525 G/C	540 G/T	558 T/A	598 T/C	601 T/C	603 G/C	616 G/A	619 C/T														
	676 T/A	679 G/C	749 G/T	750 C/G	755 G/T	763 G/A	791 T/G	804 T/C														
	818 A/G	821 G/A	870 T/C																			- 1x
11SV:	558 T/A	569 C/T	598 T/C	601 T/C	603 G/C	616 G/A	676 T/A	679 G/C														
	749 G/T	750 C/G	755 G/T	763 G/A	791 T/G	804 T/C	818 A/G	821 G/A														
	870 T/C																					- 1x
12SV:	569 C/T	598 T/C	601 T/C	603 G/C	616 G/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C														
	716 A/G	749 G/T	750 C/G	755 G/T	763 G/A	791 T/G	804 T/C	818 A/G														
	821 G/A	870 T/C																				- 1x
13SV:	242 A/C	525 G/C	540 G/T	558 T/A	569 C/T	594 G/A	598 T/C	601 T/C														
	603 G/C	616 G/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C	749 G/T	750 C/G	755 G/T														
	763 G/A	791 T/G	804 T/C	818 A/G	821 G/A	870 T/C																- 1x
14SV:	525 G/C	540 G/T	558 T/A	569 C/T	594 G/A	598 T/C	601 T/C	603 G/C														
	616 G/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C	716 A/G	755 G/T	763 G/A	791 T/G														
	804 T/C	818 A/G	821 G/A	870 T/C																		- 1x
15SV:	525 G/C	540 G/T	558 T/A	569 C/T	594 G/A	598 T/C	601 T/C	603 G/C														
	616 G/A	619 C/T	676 T/A	679 G/C	716 A/G	749 G/T	750 C/G	755 G/T														
	763 G/A	791 T/G	804 T/C	818 A/G	821 G/A	870 T/C																- 1x

Obr. 10: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 3849, *vmpI* gen (u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1RV:	1211 G/A																						- 5x
2RV:	613 G/A																						- 4x
3RV:	613 G/A	618 C/G	1211 G/A																				- 4x
4RV:	690 C/G	1133 A/G																					- 3x
5RV:	813 T/C																						- 3x
6RV:	1133 A/G																						- 1x
7RV:	690 C/G	1133 A/G																					- 1x
8RV:	613 G/A	1211 G/A																					- 1x

Tab. 14: Výskyt synonymních a nesynonymních mutací v konkrétním vzorku genu *vmp1*

VZOREK				
Počet kolonií	NT záměna	Pozice	AK záměna	Pozice
227.2				
2	G/A	307	G/S	103
4	A/G	347	N/S	116
4	C/G	620	A/G	207
2	T/C	703	N/N	234
3	G/A	899	E/K	300
8	A/G	981	K/R	327
4	G/A	1405	G/R	469
2857				
8	T/C	70	N/N	24
9	T/G	88	A/A	30
10	G/A	113	A/T	38
3	T/C	133	L/L	45
4	T/C	261	V/A	87
3	T/C	431	F/L	144
4	T/A	529	G/G	176
4	A/G	578	N/D	193
10	G/A	801	F/L	267
5	G/A	806	D/N	269
10	T/A	881	C/S	294
6	A/G	976	S/S	326
6	C/T	1317	T/I	439
3745				
4	A/C	242	N/H	81
4	G/C	525	S/T	175
5	G/T	540	C/F	180
13	T/A	558	I/N	186
6	C/T	569	R/C	190
7	G/A	594	C/Y	198
7	T/C	598	C/C	199

Tab. 14: Výskyt synonymních a nesynonymních mutací v konkrétním vzorku genu *vmp1* (pokračování)

VZOREK				
Počet kolonií	NT záměna	Pozice	AK záměna	Pozice
3745				
8	T/C	601	C/C	200
7	G/C	603	C/S	201
8	G/A	616	E/K	205
7	C/T	619	A/A	206
11	T/A	676	F/L	225
10	G/C	679	N/K	226
5	A/G	716	I/I	239
6	G/T	749	A/W	250
6	C/G	750	A/W	250
12	G/T	755	V/L	252
12	G/A	763	K/K	254
12	T/G	791	L/V	264
8	T/C	804	V/A	268
7	A/G	818	N/D	273
7	G/A	821	A/T	274
7	T/C	870	V/A	290
7	A/G	1268	K/E	423
3849				
10	G/A	613	E/K	205
4	C/G	618	A/A	206
4	C/G	690	H/Q	230
3	T/C	813	F/L	271
5	A/G	1133	N/S	378
10	G/A	1211	A/T	405

V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 227.2 *stamp* genu byla identifikována přítomnost 2 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZHS), a to v 95% případů, druhý haplotyp (1HS) se odlišoval dvěma záměnami, A118G a T470C a vyskytoval se v 5 % populace. Celkem byly u vzorku 227.2 zjištěny 4 mutace, z nichž všechny byly nesynonymní (viz Tab. 15).

V genu *stamp* izolátů 2857 byla nejčastější záměnou C214A, která se vyskytla u 57,5 % populace. Dalšími častými záměnami byly C114T u 40 % populace, A203T u 37,5 % populace a G188A u 35 % populace. Nejméně častá byla záměna T256A u 12,5 % populace. Celkem bylo u vzorku 2857 zjištěno 76 mutací, z nichž 6,6 % tvořily synonymní mutace a 93,4 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 15). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 2857 byla identifikována přítomnost 10 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp 1PS a to v 52,5 % případů (viz Obr. 11).

V genu *stamp* izolátů 3058 byla nejčastější záměnou C422G, která se vyskytla u 12,5 % populace. Méně časté byly záměny T313C a A97G u 7,5 %. U vzorku 3058 zjištěno 11 mutací, z nichž všechny byly nesynonymní (viz Tab. 15). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 3058 byla identifikována přítomnost 3 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZRJS) a to v 87,5 % případů, haplotyp 1RJS (7,5%) je charakterizován záměnami A97G, T313C a C422G, a haplotyp 2RJS (5%) záměnou C422G.

V genu *stamp* izolátů 3745 byly nejčastějšími záměnami G377A a A320T, které se vyskytly u 12,5 % populace. Méně časté byly záměny A405C, T388A, G371T, A344G, G311T, G308C, G298T, C274A a A215G u 10 % populace. Celkem bylo u sekvencí ze vzorku 3745 zjištěno 46 mutací, z nichž 8,7 % tvořily synonymní mutace a 91,3 % tvořily nesynonymní mutace (viz Tab. 15). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 3745 byla identifikována přítomnost 3 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZSS) a to v 87,5 % případů (viz Obr. 12).

V genu *stamp* izolátů 3849 se vyskytly záměny T157C a A438G u 10 % populace. Celkem bylo u vzorku 3849 zjištěno 8 mutací, z nichž všechny byly nesynonymní (viz Tab. 15). V rámci populace fytoplazmy získané ze vzorku 3849 byla identifikována přítomnost 4 haplotypů, nejčastěji zaznamenaným byl haplotyp základní (ZRS) a to v 85 % případů (viz Obr. 13).

Obr. 11: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 2857, *stamp* gen
(u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1PS:	214 C/A					– 21x
2PS:	114 C/T	188 G/A	203 A/T			– 10x
3PS:	114 C/T	188 G/A	203 A/T	256 A/T	490 T/A	– 2x
4PS:	114 C/T	214 C/A	490 T/A			– 1x
5PS:	114 C/T	188 G/A	214 C/A	490 T/A		– 1x
6PS:	114 C/T					– 1x
7PS:	114 C/T	203 A/T				– 1x
8PS:	114 C/T	203 A/T	490 T/A			– 1x
9PS:	114 C/T	188 G/A	203 A/T	256 A/T		– 1x

Obr. 12: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 3745, *stamp* gen
(u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

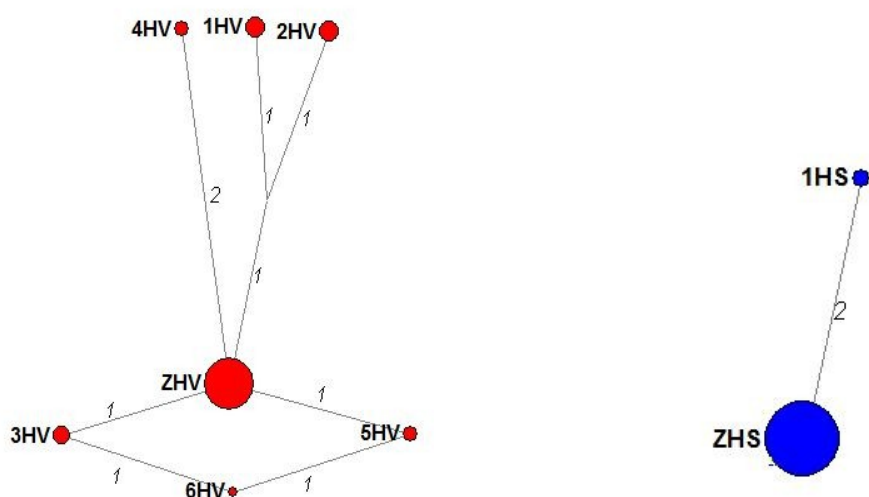
1SS:	215 A/G	274 C/A	298 G/T	308 G/C	311 G/T	320 A/T	344 A/G
	371 G/A	377 G/A	388 T/A	405 A/C	– 4x		
2SS:	320 A/T	377 G/A			– 1x		

Obr. 13: Charakteristika haplotypů populace fytoplazmy stolburu ze vzorku 3849, *stamp* gen
(u haplotypu uvedeno označení, charakteristické nukleotidové záměny a jeho četnost)

1RS:	438 A/G		– 2x
2RS:	157 T/C		– 2x
3RS:	157 T/C	438 A/G	– 2x

Tab. 15: Výskyt synonymních a nesynonymních mutací ve *stamp* genu izolátů fytoplazmy stolburu v konkrétním vzorku

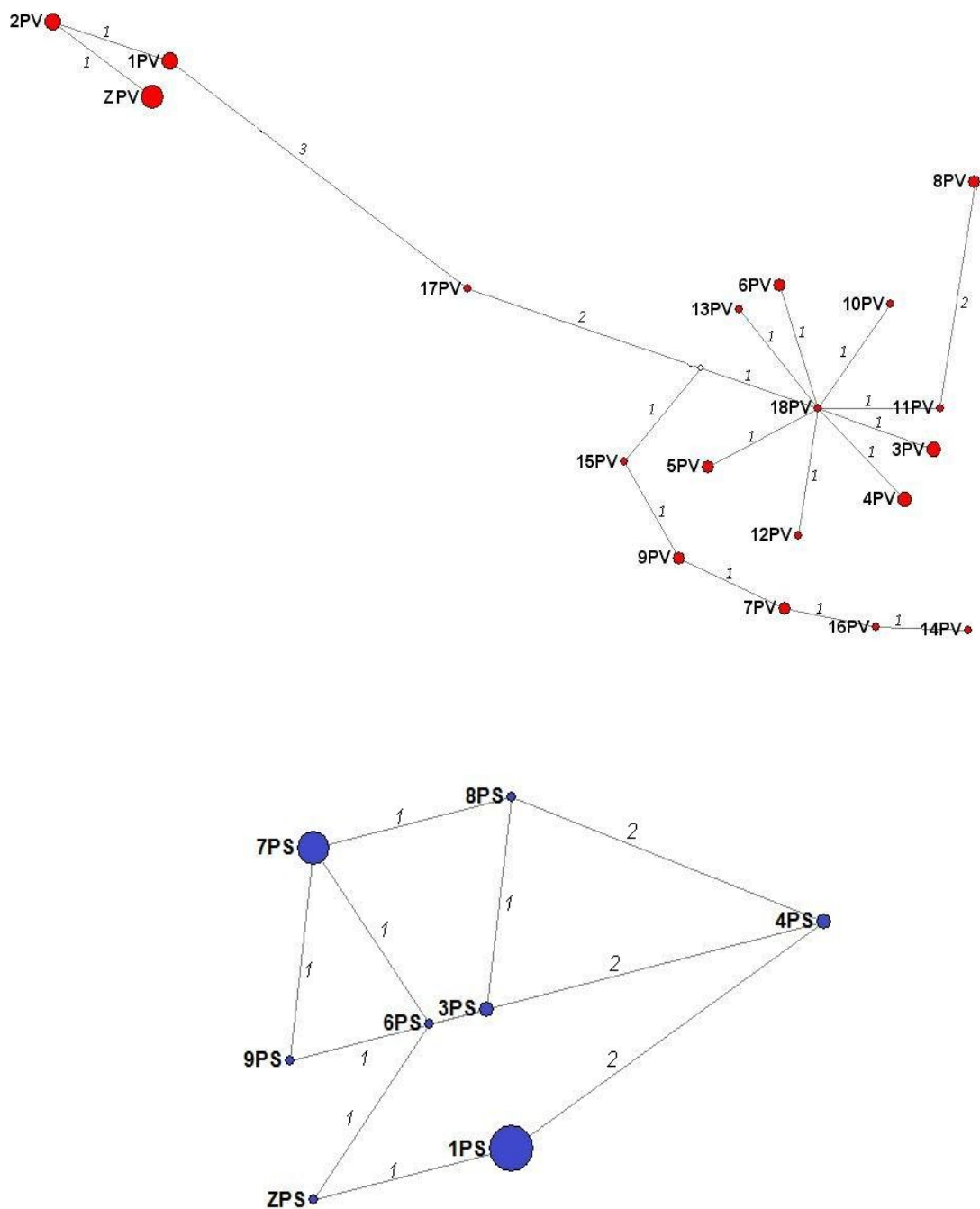
VZOREK				
Počet kolonií	NT záměna	Pozice	AK záměna	Pozice
227.2				
2	A/G	118	S/G	40
2	T/C	470	V/A	157
2857				
16	C/T	114	T/I	38
14	G/A	188	G/S	63
15	A/T	203	T/S	68
23	C/A	214	D/E	72
3	A/T	256	Q/H	86
5	T/A	490	L/L	164
3058				
3	A/G	97	K/E	33
3	T/C	313	F/L	105
5	C/G	422	T/R	141
3745				
4	A/G	215	T/A	72
4	C/A	274	E/D	92
4	G/T	298	K/N	100
4	G/C	308	A/R	103
4	G/T	311	V/L	104
5	A/T	320	T/S	107
4	A/G	344	K/E	115
4	G/T	371	A/S	124
5	G/A	377	E/K	126
4	T/A	388	V/V	130
4	A/C	405	N/T	135
3849				
4	T/C	157	F/S	53
4	A/G	438	K/E	146



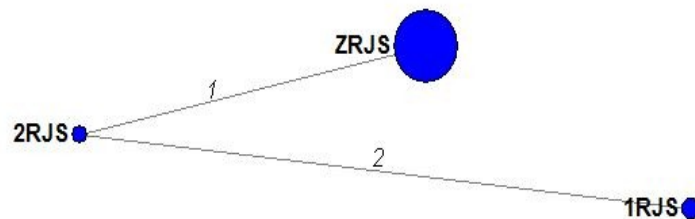
Obr. 14: Haplotypová síť izolátů fytoplazmy stolburu sestavená na základě analýzy sekvencí genů *vmp1* (červeně) a *stamp* (modře) populace infikující žilnatku vironosnou. (ZHV-6HV, ZHS-1HS: jednotlivé identifikované haplotypy, průměr kruhu vyjadřuje četnost haplotypu v populaci, 1-2: počet mutací).

Variabilita populací byla studována pomocí analýzy haplotypů, median-joining algoritmu programu NETWORK v. 4.6.6.1. V rámci populace fytoplazmy stolburu původem z žilnatky vironosné byla zjištěna malá variabilita. U obou analyzovaných genů byly nejčastěji zastoupeny základní haplotypy – ZHS a ZHV. Ostatní haplotypy, jak v rámci genu *vmp1*, tak v rámci genu *stamp*, vznikly v důsledku jednonukleotidových mutací z těchto haplotypů (viz Obr. 14).

V rámci populace fytoplazmy stolburu původem z pcháče rolního byla zjištěna velká variabilita. U *vmp1* genu se vytvořily dva vzdálené klastry. První klastř vychází z haplotypu 2PV, z něho dva další, z nichž haplotyp ZPV byl celkově nejčetnější. Druhým klastř vychází z haplotypu 18PV, od něhož se nejvíce lišil se šesti mutacemi haplotyp 14PV. U *stamp* genu se taktéž vytvořily dva klastry. První klastř vychází z nejčastěji zastoupeného haplotypu 1PS a druhý klastř z druhého nejčastějšího haplotypu 7PS. Analýzou haplotypů bylo zjištěno, že ostatní haplotypy, jak v rámci genu *vmp1* tak v rámci genu *stamp*, vznikly mutačním rozrůzněním. Zjištěná variabilita mezi oběma klastřmi je natolik velká, že je pravděpodobné, že k jejímu vytvoření došlo v důsledku směsné infekce (viz Obr. 15).



Obr. 15: Haplotypová síť izolátů fytoplazmy stolburu sestavená na základě analýzy sekvencí genů *vmp1* (červeně) a *stamp* (modře) populace fytoplazmy infikující pcháče rolního. (ZPV-18PV, ZPS-9PS: jednotlivé identifikované haplotypy, průměr kruhu vyjadřuje četnost haplotypu v populaci, 1-2: počet mutací).



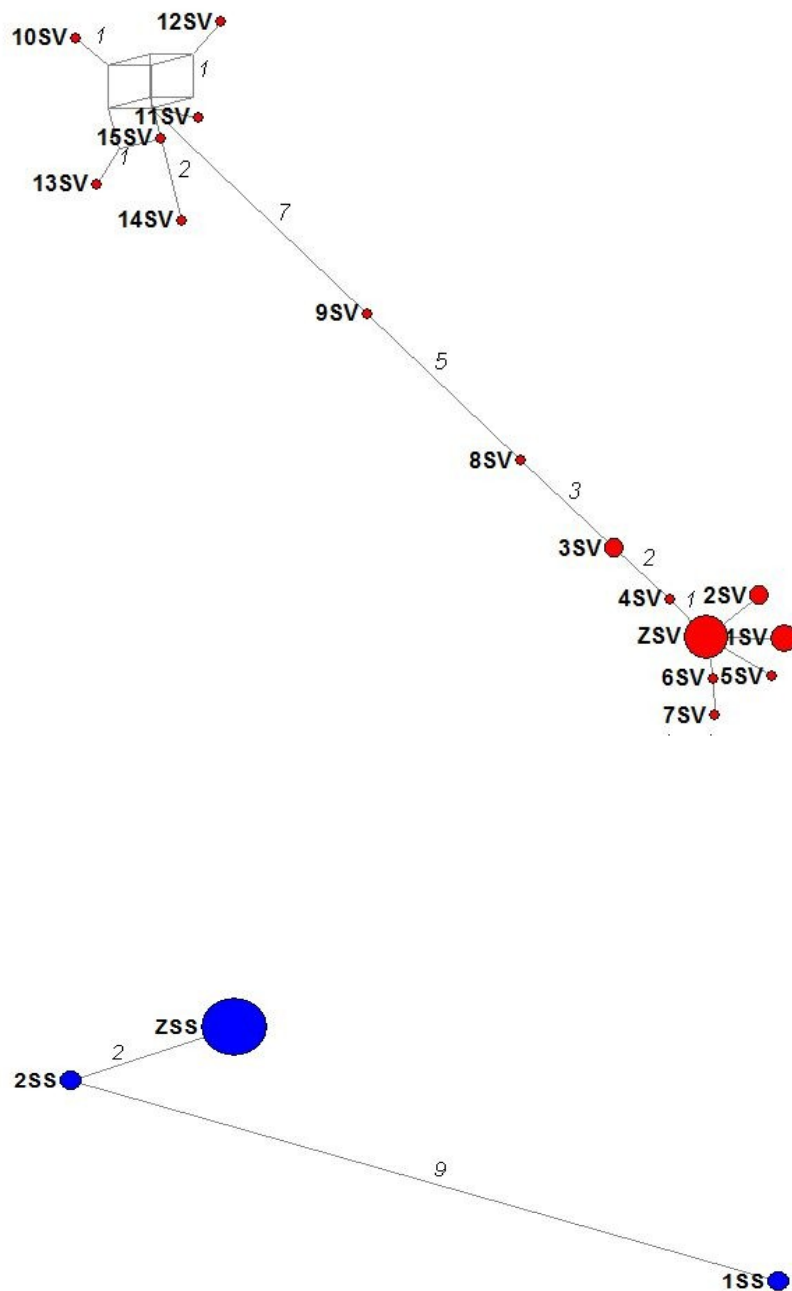
Obr. 16: Haplotypová síť izolátů fytoplazmy stolburu sestavená na základě analýzy sekvencí genu *stamp* populace infikující rajče jedlé.

(ZRJS– 2RJS: jednotlivé identifikované haplotypy, průměr kruhu vyjadřuje četnost haplotypu v populaci, 1-2: počet mutací).

V rámci populace fytoplazmy stolburu původem z rajčete jedlého byla zjištěna velmi malá variabilita. Nejčastěji byl zastoupený haplotyp ZRJS, ostatní méně početné *stamp* haplotypy, vznikly v důsledku jednonukleotidových mutací při zmnožování fytoplazmy v rostlině (viz Obr. 16).

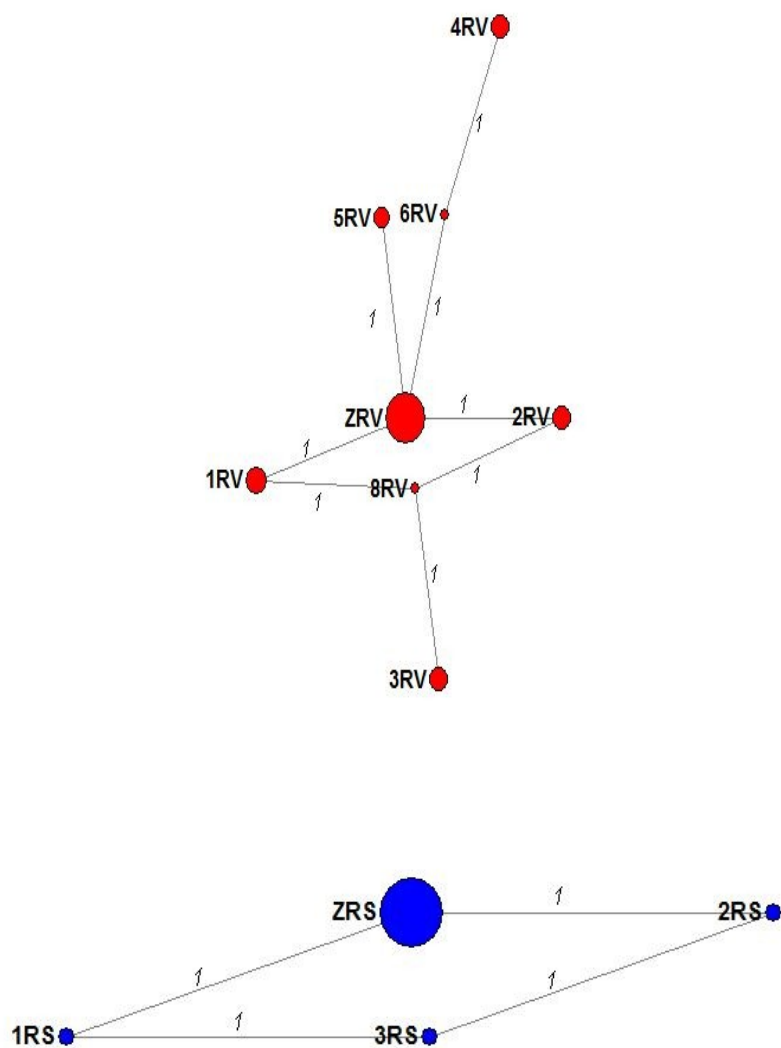
V rámci populace fytoplazmy stolburu původem ze svačce rolního byla zjištěna velká variabilita. Nejčastěji byl zastoupený haplotyp ZSS u *stamp* genu a ZSV u *vmp1* genu. Jak v rámci genu *vmp1* tak v rámci genu *stamp* došlo k vytvoření dvou samostatných klastrů. První *vmp1* klastr vychází z haplotypu ZSV a druhý klastr z haplotypu 11SV. Mezi těmito klastry se nachází haplotypy 9SV a 8SV, které se od obou liší nejvíce mutacemi. U *stamp* genu byl vychází první klastr z haplotypu ZSS a druhý je tvořen haplotypem 2SS. Oba tyto haplotypy se od sebe liší 11 mutacemi. Velká variabilita mezi oběma klastry naznačuje, že tato populace vznikla v důsledku směsné infekce. Analýzou haplotypů bylo zjištěno, že ostatní haplotypy, jak v rámci genu *vmp1* tak v rámci genu *stamp*, vznikly v důsledku jednonukleotidových mutací (viz Obr. 17).

V rámci populace fytoplazmy stolburu původem z révy vinné byla zjištěna poměrně malá variabilita. Nejčastěji byly zastoupeny haplotypy ZRS a ZRV, ostatní haplotypy se z nich rozrůznily v důsledku jednonukleotidových změn (viz Obr. 18).



Obr. 17: Haplotypová síť izolátů fytoplazmy stolburu konstruovaná na základě analýzy sekvencí genů *vmp1* (červeně) a *stamp* (modře) populace infikující svlačec rolní.

(ZSV-15SV, ZSS-2SS: jednotlivé identifikované haplotypy, průměr kruhu vyjadřuje četnost haplotypu v populaci, 1-9: počet mutací).



Obr. 18: Haplotypová síť izolátů fytoplazmy stolburu sestavená na základě analýzy sekvencí genů *vmp1* (červeně) a *stamp* (modře) populace infikující révu vinnou.

(ZRV-8RV, ZRS-3RS: jednotlivé identifikované haplotypy, průměr kruhu vyjadřuje četnost haplotypu v populaci, *l*: počet mutací).

6. Diskuse

Ke zjištění molekulární variability populací fytoplazmy stolburu v rostlinných hostitelích a hmyzím vektoru bylo analyzováno pět vzorku pocházejících z révy vinné, svlačce rolního, rajčete jedlého, pcháče rolního, typických hostitelů fytoplazmy stolburu v Evropě i v České republice (Cimerman a kol., 2009; Navrátil a kol., 2009; Langer a Maixner, 2004) a vektora žilnatky vironosné. Žilnatka vironosná je hlavním přenašečem fytoplazmy stolburu (Lessio a kol., 2007; Sforza a kol., 1998), kterou přenáší z rezervoárových rostlin jako je například svlačec rolní na konečného hostitele jako je například réva vinná (Fialová a kol., 2009; Bressan a kol., 2006; Sforza a kol., 1999, Navrátil a kol., 2009).

Molekulární variabilita populací fytoplazmy stolburu byla studována prostřednictvím neribozomálních genů *stamp* a *vmp1*. Pro 'nested' PCR izolátů *stamp* genu byla použita kombinace primerů StampF/StampR0 a StampF1/StampR1 podle Fabre a kol. (2010). Pro 'nested' PCR izolátů *stamp* genu byla použita kombinace primerů StolH10F1/StolH10R1 podle Cimerman a kol. (2009) a TYPH10F/TYPH10R podle Fialová a kol. (2009). Analýza získaných sekvencí genu *stamp* a *vmp1* poskytla informace o jejich variabilitě.

In silico RFLP analýza sekvencí *vmp1* genu prokázala přítomnost dvou restričních profilů. Profil I (V2) vykazovaly všechny izoláty fytoplazmy stolburu z pcháče rolního, révy vinné a žilnatky vironosné. Stejný profil zaznamenali Pacifico a kol. (2009) u fytoplazmy stolburu z révy vinné pocházející z Itálie i Francie, zatímco u žilnatky vironosné doposud detekován nebyl. Fialová a kol. (2009) zaznamenali profil I (V2) u izolátů fytoplazmy stolburu pcháče rolního z lokality Lednice i révy vinné pocházející z Březí, avšak u izolátů fytoplazmy stolburu révy vinné z Perné tento profil nebyl identifikován. Přítomnost fytoplazmy stolburu patřící k *vmp1* profilu I (V2) zaznamenali na révě vinné společně s dalšími osmi profily i Murolo a kol. (2010).

Profil V (V4) byl detekován pouze u izolátů stolburu ze svlačce rolního. Fialová a kol. (2009) na izolátu pocházejícího také z fytoplazmy stolburu ze svlačce ze stejné lokality, Perná, tento profil nezaznamenali. Nejedná se ale o ojedinělý nále, protože stejný profil byl v české republice u svlačce rolního zaznamenán z lokality Lednice. Stejně tak Pacifico a kol. (2007) detekovali přítomnost profilu V u fytoplazmy stolburu ze svlačce rolního původem z Itálie.

Námi zjištěná variabilita *vmp1* genu pomocí *in silico* RFLP analýzy byla nižší, než variabilita zjištěná u všech uvedených autorů, což je vysvětlitelné malým souborem analyzovaných vzorků.

Fylogenetická analýza izolátů fytoplazmy stolburu na základě *vmp1* genu potvrdila výsledky z předchozích BLAST a RFLP analýz. Ze struktury získaného dendrogramu vyplývá, že mezi izoláty pocházejícími z žilnatky vironosné, pcháče rolního a révy vinné je vysoká příbuznost, *vmp1* gen vykazoval poměrně malou variabilitu. Jedinou průkazně odlišnou skupinou byly izoláty fytoplazmy stolburu získané ze svlačce rolního, které byly fylogeneticky vzdálenější a vytvořily samostatnou větev. Přestože *vmp1* gen považuje více autorů za velmi variabilní a vhodný pro rozlišení izolátů fytoplazmy stolburu s ohledem na jejich hostitelský původ (Cimerman a kol., 2009; Pacifico a kol., 2009), v analyzovaném souboru vzorků nebylo toto zjištění potvrzeno.

Z fylogenetické analýzy izolátů na základě genu *stamp* vyplývá, že vysokou příbuznost vykazovaly izoláty pcháče rolního s izoláty svlačce rolního. Vysoká příbuznost byla také mezi izoláty z žilnatky vironosné a révy vinné. Podobnou situaci zaznamenal i Fabre a kol. (2010), který identifikoval příbuznost mezi izoláty původem z žilnatky vironosné a révy vinné. Prokazatelně vysokou příbuznost vykazovaly i izoláty fytoplazmy stolburu z rajčete jedlého s izolátem ze svlačce rolního. Odlišnost izolátů fytoplazmy stolburu původem ze svlačce rolního a jejich umístění ve dvou odlišných fylogenetických větvích – první podskupina tvořená společně s izoláty stolburu z pcháče rolního a druhá podskupina tvořená společně s izoláty stolburu z rajčete jedlého – ukazují na možnost směsné infekce hostitelské rostliny.

Jak v případě *vmp1* genu, tak v případě *stamp* genu z fylogenetické analýzy vyplývá, že vysoká příbuznost mezi izoláty je vykazována bez ohledu na jejich odlišný původ. Toto zjištění potvrzuje v případě *stamp* genu fylogenetická analýza Fabre a kol. (2010) a v případě *vmp1* genu fylogenetická analýza Murolo a kol. (2010). Při porovnání variability *stamp* genu a *vmp1* genu na základě fylogenetické analýzy se jako variabilnější ukázal gen *stamp*, což je v rozporu se zjištěním Cimerman a kol. (2009) a Pacifico a kol. (2009), kteří gen *vmp1* považují za nejvariabilnější.

Poznatků o variabilitě populací fytoplazem v hostitelské rostlině nebo vektorovi je velmi omezené množství. Většina publikovaných prací se zabývá genetickou variabilitou populací hostitelské rostliny, obvykle ve větší oblasti, regionu nebo zemi, případně variabilitou fytoplazem infikujících populaci vektorů (Fabre a kol., 2010, 2011; Murolo a kol., 2010; Pacifico a kol., 2007, 2009). A snaha většiny týmů se tak soustředí na odlišení izolátů fytoplazmy z geografického nebo hostitelského hlediska.

Cílem této práce bylo zjistit genetickou variabilitu v rámci jedné konkrétní hostitelské rostliny nebo konkrétního vektora. Naše výsledky naznačují ve třech případech výskyt jednonukleotidového polymorfismu a ve dvou případech směsnou infekci. Analýza haplotypů fytoplazmy stolburu detekovaných u svlačce rolního a pcháče rolního, a to jak v případě *vmp1* genu, tak *stamp* genu, poukazuje na jejich velkou variabilitu ve sledovaných oblastech. U obou těchto izolátů vytvořily zjištěné haplotypy dva klastry, které se od sebe lišily velkým počtem mutovaných míst. Zjištěná variabilita byla především u svlačce natolik velká, že je nepravděpodobné, že by došlo k jejímu vytvoření v rámci rostliny. S největší pravděpodobností došlo k infekci rostliny ze dvou různých zdrojů, ke směsné infekci. Toto zjištění potvrzuje i fylogenetická analýza, kde v dendrogramu, jak v případě *vmp1* genu, tak v případě *stamp* genu, vytvořily samostatné větve. I když je poznatků o možné směsné infekci nebo ko-infekci hostitele dvěma fytoplazmami velmi málo, může k ní docházet. Tato situace byla již dříve popsána na základě RFLP analýzy *vmp1* nebo *SecY* genu. Murolo a kol. (2010) již dříve pozorovali směsnou infekci *vmp1* genu u svlačce rolního původem z Itálie a Sardinie, který byl infikován fytoplazmami stolburu o různých genotypech, *vmp1* profilu V12 a V15. Obdobně již dříve směsnou infekci zjištěnou na základě analýzy *Sec-Y* genu fytoplazmy stolburu u révy vinné původem z Chorvatska pozorovali Šeruga Music a kol. (2011), u které zjistili dva různé profily V2 a V18. Podobně Paltrinieri a kol. (2011) studovali variabilitu *SecY* genu fytoplazmy 'Flavescence dorée' ve vzorcích původem z révy vinné z Itálie a Srbska a za pomoci klonování PCR ampliconů a následné RFLP analýzy prokázali polymorfnost *Sec-Y* profilů u vzorků původem z révy vinné, způsobenou směsí různých genotypů fytoplazmy kolonizujících stejnou rostlinu.

Svlačec je považován za hlavní hostitelskou rostlinu, na které žijí především larvy žilnatky vironosné, ale jsou napadány i dospělci. (Kessler a kol., 2011; Sforza a kol., 1999). S velkou pravděpodobností by tedy u svlačce mohlo docházet k opakovanému sání různými jedinci žilnatky vironosné, anebo k sání larvy a dospělého, což by mohlo vést ke opakované a tím i směsné infekci fytoplazmou stolburu.

Analýza haplotypů fytoplazmy stolburu detekovaných u révy vinné, a to jak v případě *vmp1* genu, tak *stamp* genu, a u rajčete jedlého v případě *stamp* genu, poukazují na jejich poměrně malou variabilitu ve sledovaných oblastech. V populacích fytoplazmy došlo v průběhu zmnožení fytoplazmy ke vzniku malého množství jednonukleotidových mutací. Zaznamenaný jednonukleotidový polymorfismus ukazuje, že populace fytoplazmy stolburu infikující danou hostitelskou rostlinu není homogenní. Analýza haplotypů pak prokazuje, že tato variabilita nevznikla v důsledku opakované infekce rostliny, ale naopak rozrůzněním z jednoho donorového haplotypu. Dá se předpokládat, že nízká variabilita může souviset s tím, že fytoplazma stolburu byla přizpůsobená prostředí a izoláty vykazovaly dostatečnou fitness.

Data získaná u vektora žilnatky vironosné, jak v případě *vmp1* genu, tak *stamp* genu, poukazují na malou variabilitu. V rámci populace žilnatky vironosné může malá variabilita souviset s omezeným množstvím kopií fytoplazmy stolburu, které mohou s ohledem na velikost vektora v žilnatce vironosné přežít. Malá variabilita může také souviset s tím, že tento vektor může být infikován fytoplazmou stolburu v různých stádiích svého životního cyklu (Valenta, 1953), a proto se u něj může vyskytovat malé množství jednonukleotidových mutací.

Výskyt synonymních a nesynonymních mutací je obecně spojován se schopností patogena přizpůsobit se měnícím se podmínkám prostředí, hostitele, v němž žije. V případě rostlinných RNA virů je tato variabilita naprosto běžná, a populace virů se často skládají z několika genetických variant. Jejich distribuce může poskytnout důkaz o populaci, míře její diferenciace a vlivu faktorů jako je poloha v rostlině nebo samotná hostitelská rostlina (Roossinck, 2003). Na jedné straně jsou mutace hlavním zdrojem genetické variability a na druhé straně mutace obvykle způsobují sníženou fitness. Všeobecně se předpokládá, že mutace je proces, ze kterého živé organismy nemohou mít prospěch, aniž by neutrpěly negativní důsledky (Carrasco a kol., 2007). I když je v současné době jen málo pochyb o tom, že synonymní substituce u rostlinných RNA virů nemusí být neutrální, zatím není žádné systematické kvantitativní posouzení jejich efektu na fitness (Cuevas a kol., 2011). Dá se předpokládat, že s velkou pravděpodobností by obdobné faktory mohly uplatňovat i u fytoplazem v rámci populace jednoho hostitele nebo vektora. Ve všech případech analyzovaných populací fytoplazmy stolburu, jak na základě *vmp1* tak *stamp* genu, byla zjištěna vysoká frekvence nesynonymních mutací. Populace vykazují obdobný trend, jaký

zaznamenali Fabre a kol. (2010). Při studiu variability genu *stamp* zjistili poměr synonymních a nesynonymních mutací 2,78 a tuto situaci spojují s pozitivním selekčním tlakem vůči tomuto genu, získané výsledky naznačují i situaci i v případě *vmp1* genu.

7. Závěr

Cílem této práce bylo zjištění genetické variability populací fytoplazmy stolburu v rostlinných hostitelích a hmyzím vektoru prostřednictvím genů *vmp1* a *stamp*, a to pomocí sekvenační analýzy, fylogenetické analýzy, analýzy haplotypů a *in silico* RFLP analýzy.

Na základě *in silico* *RsaI*/RFLP *vmp1* genu byl u izolátů fytoplazmy stolburu původem z pcháče rolního, révy vinné a žilnatky vironosné zjištěn profil I (V2). U izolátů původem ze svlačce rolního byla zjištěna podobnost s profilem skupiny V (V4).

Na základě analýzy sekvencí *vmp1* genu byla prokázána vysoká fylogenetická příbuznost izolátů fytoplazmy stolburu původem z pcháče rolního, révy vinné a žilnatky vironosné. Fylogeneticky odlišné byly izoláty fytoplazmy stolburu původem ze svlačce rolního. Daný gen nelze použít k rozlišení izolátů fytoplazmy na základě hostitelské specifity nebo původu.

Na základě analýzy sekvencí *stamp* genu byla prokázána fylogenetická příbuznost mezi izoláty fytoplazmy stolburu původem z plevelných rezervoárových rostlin svlačce rolního a pcháče rolního, mezi izoláty z vektora žilnatky vironosné a hostitele révy vinné, a mezi izoláty ze svlačce rolního a rajčete jedlého.

V rámci hodnocených vzorků bylo zjištěno, že gen *stamp* je variabilnější než *vmp1* gen. Výskyt izolátů fytoplazmy stolburu ze svlačce rolního ve dvou odlišných větvích, zde poukázalo na možnou směsnou infekci. Analýza populací fytoplazmy stolburu z jednotlivých hostitelů a vektora prokázala různou úroveň jednonukleotidového polymorfismu, byla detekována přítomnost nejméně dvou haplotypů.

U populací fytoplazmy stolburu původem z pcháče rolního a svlačce rolního byla zjištěna velká variabilita haplotypů, a to jak v rámci *vmp1* genu, tak v rámci *stamp* genu. Rozdělení haplotypů do dvou samostatných klastrů haplotypové sítě a jejich genetická vzdálenost, společně s fylogenetickou analýzou, prokázala přítomnost směsné infekce hostitelských rostlin.

U populací fytoplazmy stolburu z révy vinné, rajčete jedlého a žilnatky vironosné byla v obou genech zjištěná malá genetická variabilita. Ke vzniku detekovaného jednonukleotidového polymorfismu došlo v důsledku mutací, které vznikly při zmnožení fytoplazmy v rostlině nebo vektorovi.

8. Seznam použitých zkratk

BN	Bois noir
bp	base pair (páry bází)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleový kyselina)
dNTP	deoxynucleosid triphosphate (deoxynukleozidtrifosfát)
ELISA	enzyme linked Immunosorbent Essay (imunoenzymatická metoda)
ICBS	The International Committee of Systematic Bacteriology
LN	Legno nero
MLOs	mycoplasma-like organisms
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RFPL	restriction fragment length polymorphism (détkový polymorfismus restrikčních fragmentů)
rpm	počet otáček za minutu
STOL	stolbur phytoplasma (fytoplazma stolburu)
TAE	Tris acetate EDTA buffer (Tris-acetátový EDTA pufr)
VK	Vergilbungskrankheit
16S rRNA	ribosomální RNA se sedimentačním koeficientem 16S
16S rDNA	ribosomální DNA se sedimentačním koeficientem 16S

9. Seznam použité literatury

- Agrios, G. N. (1997): Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. *Plant Pathology* 4: 457-470.
- Avramov, Z., Contaldo, N., Bertacciny, A., Sakaliev, D. (2011): First report of stolbur phytoplasma in *Prunus avium* in Bulgaria. *Bulletin of Insectology* 64: 71-72.
- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Ahrens, U., Seemüller, E. (1994): Detection of mycoplasma-like organisms in declining oaks by polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* 24: 55-63.
- Bai, X.D., Zhang, J.H., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682-3696.
- Bandelt, H.-J., Forster P., Röhl, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Battle, A., Altabella, N., Sabate, J., Laviña, A. (2008): Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species, by *Macrosteles quadripunctulatus*. *Annals of Applied Biology* 152: 235-242.
- Bertaccini, A. (2007): Phytoplasma: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Blatný, C., Brčák, J., Limberk, J., Bojňanský, V. (1956): Příspěvek k epidemiologii stolburu v ČR se zvláštním zřetelem na brambory. *Československá Biologie* 5: 95-104.
- Boudon-Padieu, E. (2003): The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. 14th ICVG Conference, Locorotondo, pp. 47-53.
- Bressan, A., Turata, R., Maixner, M., Spiazzi, S., Boudon-Padieu, E., Girolami, V. (2006): Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* 150: 331-339.
- Carrasco, P., Iglesia, F., Elena S., F. (2007): Distribution of Fitness and Virulence Effects Caused by Single-Nucleotide Substitutions in *Tobacco Etch Virus*. *Journal of Virology* 81: 12979–12984.
- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C., Foissac, X. (2009): Striking diversity of *vmpl*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 2951-2957.
- Chaturvedi, Y., Singh, M., Snehi, S. K., Raj, S. K., Rao, G. P. (2010): First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16Sr I group) associated with yellows and little leaf diseases of *Hibiscus rosa-sinensis* in India. *Plant Pathology* 59: 796.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1175-1184.

- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10: 526-535.
- Cuevas, J., M., Domingo-Calap, P., Sanjuan, R., (2011): The fitness effects of synonymous mutations in DNA and RNA viruses. Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, H., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem element of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or pawlownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Ember, I., Acs, Z., Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., Kolber, M. (2011): Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *Journal of Plant Pathology* 130: 367-377.
- Fabre, A., Danet, J.-L., Foissac, X. (2010): The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472: 37-41.
- Fabre, A., Balakishiyeva, G., Amber, I., Omar, A., Acs, Z., Kölber, M., Kauzner, L., Della Bartola, M., Danet, J.-L., Foissac, X. (2011): *StAMP* encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): 21-22.
- Fialová, R. (2008): Interakce fytoplazem s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 26-30.
- Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J.-L., Šafářová, D., Foissac, X., Navrátil, M. (2009): Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia. *Journal of Plant Pathology* 91: 411-416.
- Firrao, G., Gobi, E., Locci, R. (1993): Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 602-607.
- Firrao, G., Gibb, K., Streten, C. (2005): Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology* 87: 249-263.
- Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C. (2005): Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescente dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology* 147: 191-201.
- Gao, Y., Qiu, P.-P., Liu, W.-H., Su, W.-M., Gai, S.-P., Liang, Y.-C., Zhu X.-P. (2012): Identification of 'Candidatus Phytoplasma solani' associated with Tree Peony Yellows Disease in China. *Journal of Plant Pathology* 87: 249-263.
- Gatineu, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richardmolard, M., Boudon-Padieu, E. (2001): A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology* 107: 263-271.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rhner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176: 5244-5254.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., Namba, S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.

- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, B., Gruden, K., Ravnikar, M. (2007): Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56: 785-796.
- Ivanović, Ž., Trkulja, N., Živković, S., Dolovac, E. P., Dolovac, N., Jović, J., Mitrović, M. (2011): First report of stolbur phytoplasma infecting celery in Serbia. *Bulletin of Insectology* 64: 239-240.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Krnjajić, S., Redinbaugh, M. G., Pratt, R. C., Gingery, R. E., Hogenhout, S. A., Toševski, I. (2007): Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 118: 85-89.
- Kakizawa, S., Osníma, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2001): Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 1043-50.
- Kessler, S., Schaerer, S., Delabays, N., Turlings, T. C. J., Trivellone, V., Kehrl, P. (2011): Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the grapevine yellows disease 'bois noir', in Switzerland. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 139: 60-67.
- Kölber, M., Ember, I., Varga, K., Botti, S., Martini, M., Lázár, J., Bertaccini, A. (2003): Sixyear survey of grapevine yellows distribution in Hungary. 14th ICVG Conference, Locorotondo, pp. 99-100.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., Seemüller, E. (2008): The linear chromosome of the plantpathogenic mycoplasma 'Ca. P. mali'. *BMC Genomics* 9: 306.
- Langer, M., Maixner, M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43: 191-199.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. (1998a): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998b): Revise classification scheme of phytoplasmas based an RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E. (2000): Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Lessio, F., Tedeschi, R., Alma, A. (2007): Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in north-western Italy. *Journal of Plant Patology* 89: 97-102.
- Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., Chen, T.A. (2002): Production of monoclonal antibodies against Apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology* 108, 81-86.
- Marcone, C. (2010): Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. In: Weintraub, P. G., Jones, P., (Eds.): *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. CABI, Wallingford, UK, pp. 114-131.

- Marzachi, C. (2006): Molecular diagnosis of Phytoplasmas. Arab Journal of Plant Protection 24: 139-142.
- Milkus, B., Clair, D., Idir, S., Habili, N., Boudon-Padieu, E. (2005): First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. Plant Pathology 54: 236-236.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., Romanazzi, G. (2010): Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. Journal of Applied Microbiology 109: 2049-2059.
- Murrall, D.J., Nault, L.R., Hoy, C.W., Madlen, L.V., Miller, S.A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Journal of Economic Entomology 89: 1223-1232.
- Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Lauterer, P., Šafařová, D., Starý, M. (2009a): The incidence of stolbur disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). Crop protection 28: 898-904.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nature Genetics 36: 27-29.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2001): A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like domains: clue to viral ancestry or result of virus/plastid recombination. Virology 285: 270-277.
- Pacifico, D., Foissac, X., Veratti, F., Marzachi, C. (2007): Genetic diversity of Italian and French „bois noir“ phytoplasma isolates. Bulletin of Insectology 60: 345-346.
- Pacifico, D., Alma, A., Bagnoli, B., Foissac, X., Pasquini, G., tessitori, M., Marzachi, C. (2009): Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. Phytopathology 99: 711-715.
- Paltrinieri, S., Contaldo, N., Dal Molin, F., Mitrovic, J., Duduk, B., Bertaccini, A. (2011): ‘Flavescence dorée’ phytoplasma strain differentiation in the translocase (*secY*) gene. Bulletin of Insectology 64: 27-28.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Bianco, P.A., Wei, W., Casati, P., Durante, G., Davis, R.E. (2009): New 16Sr subgroups and distinct single nucleotide polymorphism lineages among grapevine Bois noir phytoplasma populations. Annals of Applied Biology 154: 279-289.
- Rashidi, M., Habili, N., Ghasemi, A. (2010): First report of a stolbur phytoplasma associated with witches’ broom of Japanese spindle (*Euonymus japonicus*). Plant Pathology 59: 796.
- Riedle-Bauer, M., Sara, A., Regner, F. (2008): Transmission of a stolbur phytoplasma by the Agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). Journal of Phytopathology 156, 687-690.
- Roossnick, M., J. (2003): Plant RNA virus evolution. Microbiology 6: 406-409.

- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Mikrobiology* 143: 3381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, S., Tully, J.G. (eds): *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, New York, Academic Press, pp. 369-380.
- Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-padieu, E. (1998): The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.
- Seemüller, E., Schneider, B. (2004): 'Candidatus *Phytoplasma mali*', 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' and 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.
- Starý, M., Válová, P., Šafářová, D., Lauterer, P., Ackermann, P., Navrátil, M. (2013): Survey and molecular detection of Bois noir in vineyards of the Czech Republic – Short communication. *Horticultural Science* 2: 83-87.
- Šafářová, D., Lauterer, P., Korbášová, Z., Starý, M., Válová, P., Navrátil, M. (2011): *Hyalesthes obsoletus*, a vector of stolbur phytoplasma: current situation in South Moravia, Czech Republic. *Bulletin of Insectology* 64: 127-128.
- Šeruga Music, M., Pusic P., Fabre, A., Škoric, D., Foissac, X. (2011): Variability of stolbur phytoplasma strains infecting Croatian grapevine by multilocus sequence typing. *Bulletin of Insectology* 64: 39-40.
- Tran-Nguyen, L.T.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K.S. (2008): Comparative genome analysis of 'Ca. *P. australiense*' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. *Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190, 3979-3991.
- Trivellone, V., Pinzauti, F., Bagnoli, B. (2005): *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* 88: 103-108.
- Valenta, V. (1953): Poznámky k bionomii, vývoju a hospodárenskému významu Žilnatky vírusonosnej (*Hyalesthes obsoletus* Sign.) v Československu. *Zoologické a entomologické listy*, 267-282.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I-M., Zhao, Y. (2007): Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.
- Weintraub, P.G., Beanland, L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51, 91-111.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R., E. (2009): Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2582-2593.

- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R., E. (2013): The iPhyClassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in Molecular Biology* 938: 329-338.
- Zwolińska, A., Krawczyk, K., Pospieszny, H. (2012): Molecular Characterization of Stolbur Phytoplasma Associated with Pea Plants in Poland. *Journal of Phytopathology* 160: 317-323.