

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studium diverzity izolátů fytoplazmy proliferace

jabloně v České republice

Bakalářská práce

Autor práce: Monika Strejčková

Vedoucí práce: Dr. Ing. Jana Fránová

Konzultant : doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika STREJČKOVÁ**
Osobní číslo: **Z08451**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Studium diverzity izolátů fytoplazmy proliferace jableň v České republice**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Zásady pro vypracování:

Úvod: Fytoplasma proliferace jableň (AP) je řazena mezi karanténní organismy v ČR a způsobuje významné škody na kvalitě i kvantitě produkovaného ovoce. Cílem práce je zjištění diverzity izolátů AP zejména v genofondech a produkčních výsadbách v ČR.

Literární přehled: Bude vypracován literární přehled o významu AP, způsobu detekce a nejnovějších metodách identifikace tohoto patogena.

Materiál a metodika: Použití prumerů pro proteiny PR2, PR3 (AP8/AP10, AP13/AP10) a prumerů pro ribozomální protein rpAP15f/rpAP15r s následnou RFLP analýzou.

Výsledky a diskuse: Zjištění vhodnosti výše uvedené metodiky pro detekci a studium diverzity AP. Porovnání vlastních výsledků s literárními údaji.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Finanční podpora práce: Práce bude vypracována v rámci řešení grantu MŠMT ČR, č. OC09021; "Studium fytoplazem způsobujících onemocnění proliferace jableň a odumírání hrušní v České republice"

Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná


Seznam odborné literatury:

- Bertaccini A. (2007):** Phytoplasmas: Diversity , taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673 -689.
- Jarausch W., Saillard C., Helliott B., Garnier M., Dosba F.(2000):** Genetic variability of Apple proliferation phytoplasmas as determined by PC- RFLP and sequencing of non- Ribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes* 14: 17-24.
- Martini M., Paltrinieri S., Fisichella M., Ermacora P., Fontaneri M., De Salvador R. (2008):** Comparison of different detection systems for apple proliferation phytoplasmas in Trentino (North Italy). *Acta Horticulturae* 781:453-457.


Vedoucí bakalářské práce: **Dr. Ing. Jana Fránová**
Biologické centrum AV ČR

Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání bakalářské práce: **15. listopadu 2010**
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2011**


prof. Ing. Miroslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. listopadu 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma “Studium diverzity izolátů fytoplazmy proliferace jabloně v České republice“ vypracovala samostatně, na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucí Ing. Janě Fránové, Dr. za odborné vedení a cenné připomínky během konzultací při zpracování bakalářské práce. Současně tímto děkuji všem nejbližším spolupracovníkům na pracovišti za vytvoření vhodných podmínek pro tvorbu bakalářské práce.

Strejčková M., 2011: Studium diverzity izolátů fytoplazmy proliferace jabloně v České Republice [Study of apple proliferation phytoplasma diversity in the Czech Republic]., Faculty of Agro Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Fytoplazmy jsou prokaryotní organismy třídy *Mollicutes*. Dosud byly popsány na více než 800 rostlinných druzích. Mezi hospodářsky nejvýznamnější patří fytoplazma proliferace jabloně, která je řazena do ribozomální podskupiny 16Sr X-A (Apple proliferation, AP, '*Candidatus* *Phytoplasma mali*'). AP je považována za karanténní organismus v Evropě a v Severní Americe.

Typické symptomy AP jsou:

- výrazně zvětšené palisty, které mají morfologii pravého listu -řapík a čepel, okraj palistů je nepravidelně zoubkovaná
- malé plody s méně semeny a horší chuťovou kvalitou
- předčasné červení listů, metlovitost, abnormální růst výhonů na podzim, opakované kvetení

V předložené práci byla testována DNA vyizolovaná ze stromů podezřelých na přítomnost AP. Stromy pocházely z genofondu, z produkčních výsadeb i výsadeb drobných pěstitelů.

Pro detekci fytoplazem byla použita polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) s následnou analýzou délkového polymorfizmu restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism, RFLP).

Pro detekci a rozlišení subtypů fytoplazem AP se jeví jako uživatelsky nejvhodnější direct PCR s primery rpAP15f/ rpAP15r amplifikující DNA ribozomálních proteinů *rpS3* a *rpl 22* s následným restrikčním štěpením enzymem *AluI*.

Klíčová slova: fytoplazma, proliferace jabloně, příznaky, PCR, RFLP

Annotation:

Phytoplasmas are prokaryote organisms of the *Mollicutes* class. So far they have been described on more than 800 plant species. Apple proliferation phytoplasma, which classifies in the ribosomal subgroup 16Sr X-A (Apple proliferation, AP, '*Candidatus* Phytoplasma mali'), belongs amongst the agriculturally most important phytoplasmas. AP is considered a quarantine organism in Europe and in North America.

Common symptoms caused by AP are as follows:

notably enlarged stipules, which are morphologically like real leaves – they have petiole and lamina; the edge of the stipules is irregularly dentate

small fruits with fewer seeds and reduced flavour quality

premature reddening of leaves, witches' broom appearance, abnormal growth of shoots in the autumn, repeated blossoming

DNA isolated from trees suspected to have AP present was tested in the presented thesis. The trees originated from the gene pool, mass production planting as well as from planting of small producers.

To detect phytoplasma, the polymerase chain reaction (PCR) was used with the subsequent analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP).

To detect and differentiate AP phytoplasma subtypes, direct PCR with primers rpAP15f/rpAP15r amplifying the DNA of ribosomal proteins rpS3 and rpl 22 with subsequent restriction breakdown by *AluI* enzyme.

Key words: phytoplasma, apple proliferation, symptoms, PCR, RFLP

Tato práce byla financována grantem:

MŠMT ČR, č. OC09021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích

.....

Monika Strejčková

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1 Fytoplazmy	10
2.1.1 Ekonomicky významné fytoplazmy v podmínkách České republiky	11
2.2 Fytoplazma proliferace jabloně.....	12
2.2.1 Symptomy AP	12
2.2.2 Přenašeči AP	13
2.3 Odběr vzorků	15
2.4 Použité molekulárně biologické metody.....	16
2.4.1 PCR - Polymerázová řetězová reakce	16
2.4.2 Elektroforetická separace DNA	17
2.4.3 RFLP – Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů	18
2.4.4 Restrikční endonukleázy	19
3. Cíl práce	20
4. Materiál a metodika	21
4.1 PCR - Polymerázová řetězová reakce	22
4.1.1 Průběh amplifikačních programů u jednotlivých primerů	22
4.1.2 Schéma provedení PCR	25
4.2 RFLP – Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů	27
5. Výsledky a diskuse	29
5.1. Následná nested PCR s primery P1/P7 -> F1/B6 -> F2n/R2	29
5.2. Následná nested PCR s primery P1A/P7A -> F2n/R2	30
5.3. Nested PCR s primery F1/R0 -> F2n/R2	31
5.4. Direct PCR s primery AP5/AP4.....	31
5.5. Nested PCR s primery AP8/AP10 -> AP13/AP10.....	31
5.6. Direct PCR s primery rpAP15f/rpAP15r	31
5.7. Vytvoření standardních RFLP profilů vzorků fytoplazem.....	32
6. Závěr.....	34
7. Seznam použité literatury.....	35
8. Seznam příloh	39

1. Úvod

Do roku 1967 byla onemocnění způsobena fytoplazmami považována za choroby virového původu. Po nálezů částic podobných živočišným mykoplazmám ve floému rostlin s příznaky žloutenek následovalo mnoho studií, které ukázaly skutečnost, že onemocnění rostlin, zejména letálního charakteru, nejsou způsobeny viry, ale právě fytoplazmami (Doi a kol., 1967).

Fytoplazmy jsou ekonomicky významné patogeny, k jejichž hostitelům patří také ovocné dřeviny mírného pásu. Fytoplazmy napadající ovocné dřeviny, zejména pak '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (fytoplazma Evropské žloutenky peckovin, ESFY) a '*Ca. Phytoplasma mali*' (fytoplazma proliferace jabloně, AP) patří v podmínkách České republiky k nejvýznamnějším druhům. Oba zmínění zástupci jsou zařazeni do seznamu škodlivých organismů, které se vyskytují v zemích EU, jsou závažní pro celá společenství a jejich zavlékání a rozšiřování na jeho území je zakázáno.

Dle zákona č.147/1996 Sb., o rostlinolékařské péči a prováděcích předpisech se v ČR vztahuje ohlašovací povinnost na karanténní organismy, mezi něž jsou zařazeny fytoplazmy ESFY (European stone fruit yellows phytoplasma); AP (Apple proliferation phytoplasma); PD (Pear decline phytoplasma); STOL (Potato stolbur phytoplasma) na bramboru. Pro zamezení šíření fytoplazmových onemocnění jsou velmi důležitá preventivní opatření, používání zdravého výchozího šlechtitelského a množitelského materiálu. Fytoplazmy jsou rozšířeny na celém světě, ale existují velké rozdíly v rozšíření jednotlivých skupin a podskupin (Navrátil a Fialová 2008).

Cílem předkládané práce je molekulární charakterizace a zjištění diverzity izolátů fytoplazmy proliferace jabloně (AP) infikující jabloně zejména v genofondech a produkčních výsadbách, popř. i ve výsadbách drobných pěstitelů a v planě rostoucích stromech v ČR. Dále teoretické a praktické zvládnutí použitých metod molekulární biologie (PCR, RFLP).

Tato práce vznikla na základě finanční podpory MŠMT ČR; grantu č. OC09021 (Studium fytoplazem způsobujících onemocnění proliferace jabloní a odumírání hrušní v České republice), řešeného na Ústavu molekulární biologie rostlin na Akademii věd v Českých Budějovicích, který si klade několik cílů.

Jedním z nich je prohloubení znalostí o karanténním organismu – fytoplazmě proliferace jabloně AP pro informaci kontroly výskytu AP ve stromech jabloní v ČR.

2. Literární přehled

2.1 Fytoplazmy

Fytoplazmy (dříve nazývány *mycoplasma-like organisms*- MLO) jsou charakteristické absencí buněčné stěny, kterou alespoň částečně nahrazuje trojvrstevná 7-10 nm silná proteino-lipidická membrána. Tvar částic je pleiomorfní, většinou jsou kulovité až oválné, ale vyskytují se i ve vláknitých a větvených formách a to převážně v časných stádiích infekce. Velikost částic se pohybuje v rozmezí 200 - 800 nm (Bertaccini, 2007; Lee a Davis, 1992).

Fytoplazmový chromozom je velmi malý 600- 680 kb. Lim a Sears (1989), Kuske a Kirkpatrick (1992) byli první, kteří klonovali a kompletně osekvenovali fytoplazmový gen pro 16S rRNA.

Buňky fytoplazem jsou kulovité až oválné. Poprvé byly popsány jako kulovité bakterie (Doi a kol., 1967). Za hlavního předka fytoplazem je považována *Acholeplasma laidlawii* z třídy *Anaeroplasmata* (Weisburg a kol., 1989), protože v této třídě je triplet kódující tryptofan UGG, stejně jako u fytoplazem. Oproti tomu u ostatních prokaryot jako jsou mykoplazmy a spiroplazmy je tryptofan kódován tripletem UGA (Ho a kol., 2001). Taxonomicky je řadíme mezi fytopatogenní prokaryota, oddělení *Tenericutes*, třída *Mollicutes*, rod, '*Candidatus Phytoplasma*' (Kůdela a kol., 2002).

Jedná se o obligátní parazity, kteří mají specifické životní nároky, neumožňující jejich kultivaci *in vitro*, pouze přežít a množit se v hypotonickém prostředí, jako je floém (sítkovice) rostlin nebo buňky a tkáně hmyzích vektorů (McCoy a kol., 1984).

Přenos fytoplazem se může uskutečnit pomocí bodavě savého hmyzu z řádu strejnokřídli *Homoptera*, zahrnující čeledi merovitých (*Psyllidae*), křísových (*Cicadellidae*), žilnatkovitých (*Cixiidae*) a dále řád ploščic (*Heteroptera*), čeleď klopuškovitých (*Miridae*), kteří se živí sáním šťáv z floémových tkání rostlin. Při nasátí floémové šťávy jsou zároveň nasáti i fytoplazmy (Banttari a Zeyen, 1979; Brčák, 1979; Grylls, 1979; Tsai, 1979).

Bodavě savý hmyz je nejen vektorem, ale zároveň i alternativním hostitelem fytoplazem. Životní cyklus fytoplazem zahrnuje intracelulární fázi jak v buňkách floému hostitelské rostliny, tak v těle vektora. Významným epidemiologickým parametrem v přenosu fytoplazem, a jimi způsobených chorob, jsou potravní preference hmyzu, který je přenáší, tedy mono-, oligo- nebo polyfagie. Zimu přežívají v infikovaných vektorech a v podzemních částech vytrvalých rostlin, které pak slouží jako zdroj fytoplazmové infekce v dalším roce (Alma a kol., 1997).

Fytoplazmy se také rozšiřují vegetativním množением rostlinného materiálu, a to pomocí roubů, oček a hlíz. Mohou se přenášet kořenovými srůsty a prostřednictvím parazitických rostlin, zejména kokoticí (Lee a

Davis, 1992). V současné době probíhá výzkum zabývající se šířením fytoplazem prostřednictvím semen (Bertaccini, 2006, 2007).

Šíření fytoplazem v prostoru a čase závisí na vztahu konkrétního druhu nebo kmene fytoplazmy, jeho hostitelů a hmyzích vektorů.

Základní podmínky pro šíření choroby jsou splněny, pokud v potenciálním patosystému vedle sebe existuje virulentní kmen fytoplazmy a vnímavý hostitel, který je zároveň živnou rostlinou pro přítomného vektora.

Součástí konkrétního patosystému jsou další biotické a abiotické faktory, které mohou významně ovlivnit šíření fytoplazem.

Rozvoj epidemiologické situace je v našich klimatických podmínkách spojen vždy s existencí primárních a sekundárních zdrojů infekce, vnímavých hostitelských rostlin a přítomností efektivních vektorů.

Fytoplazmová onemocnění jsou charakterizována přeměnou květů (zelenokvětost, fylodie, sterilita), růstovými aberacemi (proliferace bočních pupenů, abnormální prodlužování internodií), nekrózami a deformacemi floému, žloutnutím či červenáním listů, zakrslostí až odumírání částí nebo celých rostlin. U rostlin infikovaných fytoplazmou bylo prokázáno porušení normální rovnováhy růstových regulátorů (Pertot a kol., 1998).

Nová éra výzkumu fytoplazem začala používáním metod založených na specifické amplifikaci, detekci a charakterizaci DNA. Pomocí molekulárních dat je možné určit diverzitu fytoplazem a zkoumat jejich vzájemné vztahy.

Pro detekci a identifikaci fytoplazem v rostlinách nebo hmyzu se používá polymerázová řetězová reakce (PCR) v kombinaci s analýzou délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Prvním krokem detekce a identifikace fytoplazem ve vzorcích je izolace celkové DNA, následuje namnožení fytoplazmám specifického úseku DNA pomocí PCR a restrikční štěpení PCR produktu příslušnými restrikčními endonukleázami.

Identitu fytoplazem zjišťujeme porovnáváním získaných restrikčních spekter s restrikčními profily kontrolních vzorků fytoplazem. Pro detekci fytoplazem v rostlině nebo hmyzu pomocí PCR je možno využít univerzální nebo skupinové primery specificky amplifikujícími segmenty fytoplazmové DNA v přímé nebo nested-PCR (Jarausch a kol., 2000).

2.1.1 Ekonomicky významné fytoplazmy v podmínkách České republiky

1) Fytoplazma evropské žloutenky peckovin (ESFY, European stone fruit yellows phytoplasma)

2) Fytoplazma proliferace jabloně (AP, Apple proliferation phytoplasma)

3) Žloutenka astry (AY, Aster yellows phytoplasma)

4) Chřadnutí hrušně (PD, Pear decline phytoplasma)

(Kůdela, 2002; Lee a kol., 1998).

2.2 Fytoplazma proliferace jabloně

(Apple proliferation phytoplasma, AP)

AP byla jako anomálie popsána již na počátku 20. století, infekční původ byl zjištěn v 50. letech v Itálii. Tato fytoplazma je rozšířena v celé Evropě (je známá z Albánie, Bosny a Hercegoviny, Bulharska, České republiky, Francie, Chorvatska, Itálie, Maďarska, Moldávie, Německa, Nizozemí, Norska, Polska, Rakouska, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Španělska, Švýcarska, Ukrajiny) a v Turecku (Jarausch a kol., 2000).

V mnoha zemích bylo zjištěno, že experimentálně infikované plodné stromy nebyly vizuálně postiženy po dobu 5 a více roků po infekci.

Dosud nebyla nalezena žádná odolná, ani tolerantní odrůda proti AP. V žádném certifikovaném množitelském materiálu jabloní nesmí být AP přítomna. AP je geneticky příbuzná s dalšími významnými fytoplazmy (Lee a kol., 1995).

Hostitelskou rostlinou je jabloň domácí (*Malus domestica*) a další druhy rodu *Malus*.

2.2.1 Symptomy AP

Symptomy se objevují zejména v tzv. šokovém stádiu (teplota +30 C° a -20 C°) ne u všech infikovaných stromů. Po 3 - 6 letech trvání symptomy zmizí, aby se později objevily znovu. Symptomy se mohou projevit už záhy po provedení hlubšího řezu.

Dochází k variabilnímu rozložení infekčního činitele v různých částech stromu v průběhu roku. V zimě jsou částice fytoplazmy soustředěny v kořenech, reinvaze do nadzemních částí nastává v předjaří. Největší nárůst fytoplazem je od léta do podzimu.

Typickým příznakem infekce AP jsou výrazně zvětšené palisty v úžlabí řapíku a metlovitost větví v horní třetině jednoletých výhonů. Palisty mají zoubkovaný okraj na rozdíl od normálních celokrajných štětinkovitých palistů. Boční výhony metel svírají s terminálem ostrý úhel. Nápadným příznakem je také pozdní a opakované kvetení. Infikované stromy jsou náchylnější k některým houbovým chorobám (příloha č. 1 - foto č. 1, příloha č. 2 - foto č. 2, 3, 4, 5).

Napadené stromy produkují méně plodů, plody jsou menší, špatně vybarvené, mají horší chuťovou kvalitu a v plodech je málo semen. Následkem je nižší sklizeň a kratší doba skladovatelnosti (Navrátil a Fialová, 2008).

2.2.2 Přenašeči AP

AP se přenáší infikovaným materiálem hostitelských rostlin při vegetativním množení (rouby, očky, infikovanými sadovnickými výpěstky a nemocnými oddělky podnoží) (Lee a Davis, 1992).

Přenos fytoplazem hmyzími přenašeči je cirkulativní, propagativní a perzistentní. Hmyz se stává efektivním přenašečem fytoplazem po úspěšném akvizičním sání na infikované rostlině, které trvá řádově hodiny až dny a po proběhnutí tzv. latentní periody. Latentní perioda, závislá mimo jiné na teplotě, trvá většinou dva až čtyři týdny.

Hmyz se stává infekčním pouze v případě, že fytoplazmy po namnožení do dostatečného titru proniknou do buněk slinných žláz, kde se opět pomnoží a odkud se během sání dostanou do nového hostitele. Fytoplazmy skupiny proliferace jabloně jsou přenášeny výhradně merami, a to zástupci rodu *Cacopsylla*, druhy rodu *C. picta* a *C. melanoneura* (Fialová a kol., 2006, 2008).

Cacopsylla melanoneura - mera černožilná

Velikost těla je cca 3,5 mm. Základní barva hlavy i hrudi je podle stáří červenohnědá až černohnědá, s bělavě žlutou kresbou. Tvářové kužele jsou zbarveny dohněda. Nohy jsou hnědé nebo černohnědé. Sklerity zadečku jsou rezavě hnědé až černohnědé. Přední křídla jsou cca 3 mm dlouhá, s žilkami žluto až černohnědými, čirá, pouze u kořene někdy slabě zakouřená. Kolem žilek jsou poměrně široké bezostné pruhy, zvláště v apikálních políčkách. *Cacopsylla melanoneura* patří k nejhojnějším druhům mer na území České republiky.

Hlavní hostitelskou rostlinou této oligofágní mery je hloh (*Crataegus*) a vývoj může proběhnout na jabloních (*Malus* spp.), hrušních (*Pyrus* spp.) a mišpulích (*Maspilus germanica*). *C. melanoneura* má jednu generaci ročně a přezimuje ve stádiu imaga, obvykle na jehličnanech (na vrchovinách a v horských nadmořských výškách na smrcích, jedlích a vzácněji na borovicích, v subalpínských polohách na kleči), v nížinách jen vzácně a výjimečně, a to na koniferách).

Jarní nálet probíhá nejdříve makrometeorologickým driftem, poté se mery aktivním letem dostávají na své hostitelské rostliny. *C. melanoneura* je časově první z vektorů fytoplazem ovocných dřevin, u něhož dochází k reaktivaci po diapauze. V závislosti na počasí začíná nálet této mery na listnaté dřeviny již od druhé poloviny února, obvykle v první polovině března a trvá do poloviny dubna.

Na hostitelských rostlinách dochází k páření a samičky kladou v delším časovém rozmezí asi 200 vajíček. Vývoj vajíčka trvá od jednoho do třech týdnů, larvální vývoj pak přibližně měsíc a dospělci nové generace se objevují od první a druhé květnové dekády. Na přelomu května a června nastává migrace mer nové generace ze sadů na zimoviště (Čermák a Lauterer, 2006, 2007).

Cacopsylla picta

Délka těla bývá cca 3 mm. Základní barva je světle zelená, po přezimování černá. Kresba především na hrudi rozlehlá, žlutá, hnědá, až černohnědá. Zadeček je zelený, v několika dnech konce přezimování tmavnoucí do hnědé až černé. Okraje skleritů jsou u samců žluté a u samic červené. Přední křídla cca 2,5 mm dlouhá, blanitá a nezakouřená. Bezostné pruhy kolem žilek jsou úzké.

Cacopsylla picta je úzce oligofágní druh mery, jehož hostiteli jsou jabloň domácí (*Malus domestica*) a jabloň lesní (*M. sylvestris*). Jarní migrace na hostitelské rostliny probíhá asi s 2 až 3 týdenním zpožděním oproti migraci *C. melanoneura*.

Zástupci druhu *C. picta* se objevují ve výsadbách přibližně na konci března nebo na začátku dubna. Nejintenzivnější nálety této mery byly pozorovány na přelomu dubna a května. Během června jedinci nové generace postupně migrují na zimoviště (Čermák a Lauterer, 2006, 2007).

2.3 Odběr vzorků

V ČR byly stanoveny následující podmínky odběru vzorků. Při prohlídce porostů stromů jabloní v rámci fyto-sanitární kontroly, zaměřené na kontrolu a průzkum výskytu škodlivých organismů se z podezřelých nebo bezpříznakových kontrolovaných stromů odeberou vzorky pro laboratorní analýzu.

Z bezpříznakových stromů odebíráme čtyři segmenty větví po obvodu koruny (nejlépe dvouleté dřevo), o délce 20-30 cm, které zbavíme listů. U stromů, které projevují příznaky AP (metlovitost, zvětšení palistů, maloplodost), odebíráme jeden segment z příznakové části stromu. Je nutné, aby lýko odebraných segmentů nebylo nekrotické nebo suché. V určitých případech, například u mladých jednoletých výpěstků můžeme odebrat menší (2 -3) segmenty výhonů i s listy.

Dřevité vzorky z nadzemních částí stromů odebíráme v měsících květen – říjen. Vzhledem ke konkrétním klimatickým podmínkám a délce vegetačního období se doporučují odběry do 15. 5 a po 15. 10. konzultovat s odborníky referenční laboratoře.

Vzorek můžeme odebírat i z kořene. V tomto případě odebíráme čtyři segmenty kořene po obvodu stromu o průměru minimálně 5 mm a délce 10-20 cm. Kořenové vzorky můžeme odebírat v průběhu celého roku.

Odebrané vzorky dvouletých výhonů zbavíme listů (u jednoletých listy ponecháme), kořenové vzorky očistíme a vložíme do mikrotenového sáčku, který po důkladném vymáčknutí vzduchu uzavřeme. Celý vzorek musí být uložen v sáčku, obal sáčku nesmí být porušen, aby vzorek nevysychal. Označíme adresu žadatele, jméno odběratele vzorku, adresu pěstitele, lokalitu, datum odběru, druh a odrůdu. Vzorky balíme ihned po odběru. Nikdy je nenecháváme na slunci a dopravíme co nejdříve do diagnostické laboratoře.

Laboratorní analýza odlistěných vzorků dvouletých výhonů a kořenů musí být provedena do 4 měsíců od data odběru vzorků při optimálním a pečlivém zabalení. Přeprava a skladování vzorků při + 4 C°.

Vzorky jednoletých výhonů s listy musíme analyzovat do jednoho týdne od data odběru vzorků při optimálním a pečlivém zabalení. Přeprava a skladování vzorků při + 4 C° (Čermák a kol., 2008).

2.4 Použité molekulárně biologické metody

2.4.1 PCR - Polymerázová řetězová reakce

(Polymerase Chain Reaction)

PCR je enzymová metoda umožňující mnohonásobné namnožení vybraného úseku DNA, amplifikaci specifických DNA sekvencí charakteristických pro patogena, kterého chceme detekovat a identifikovat.

Tato metoda umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci DNA bez jejího předchozího klonování ve vektoru.

Součástí reakce jsou 1) oligonukleotidové primery, které se po denaturaci DNA specificky připojí ke komplementární sekvenci ohraničující amplifikovanou oblast primerů-templát. Hybridizační teplotu pro přisedání primeru k templátovému jednořetězci DNA je možné určit podle vzorce:

$T_m = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) - 5$ -> čím vyšší je teplota annealingu, tím je PCR reakce specifičtější

2) termostabilní polymeráza, která v přítomnosti volných dNTP katalyzuje syntézu podle templátového řetězce. Nejčastěji používaná polymeráza je *Taq* DNA, která je získána z bakterie *Thermus aquaticus*. Optimální polymerázovou aktivitu má při 72°C, poločas inaktivace při 95°C je za 60 minut. Primery jsou orientovány tak, že každý na opačném vlákně je prodlužován směrem k druhému.

Méně známé, ale vcelku běžné jsou například polymerázy *Tth* (z eubakterie *Thermus thermophilus*), *Pwo* (izolovaná z hypertermofilní archey *Pyrococcus woesei*), *Pfu* (získána z hypertermofilního archeobaktéria *Pyrococcus furiosus*).

Činnost enzymu zajišťuje pufr, za přítomnosti Mg^{2+} ve formě $MgCl_2$ nebo $MgSO_4$. Stavebními složkami nově syntetizovaných fragmentů DNA jsou deoxynukleotid trifosfáty dNTP: (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Polymerázová řetězová reakce je cyklické opakování tří základních kroků:

1. oddělení vláken dvoušroubovice DNA teplotní denaturací (teplotou vyšší než 92 °C)
2. annealing - připojení primerů ke komplementárním úsekům DNA (při teplotě 45 – 72 °C)
3. elongace připojených primerů termostabilní DNA polymerázou (72 °C)

Cyklickým opakováním kroků (20 - 50 krát) dochází k syntéze úseku ohraničeného primery. Protože produkty předcházejícího cyklu jsou templáty cyklu následného, stoupá násobně počet kopií syntetizovaného úseku v každém cyklu. Metoda poskytuje až 10^9 násobné pomnožení cílového úseku DNA během 2 - 3 hodin (Kůdela a kol., 2002).

2.4.2 Elektroforetická separace DNA

Základní metodou identifikace a separace fragmentů DNA je elektroforéza v agarózovém gelu. Rychlost pohybu DNA v agarózovém gelu při elektroforéze závisí na: koncentraci agarózy, molekuly DNA se pohybují v agarózovém gelu s rozličnou koncentrací různou rychlostí. Mezi logaritmem elektroforetické pohyblivosti DNA (m) s koncentrací gelu (t) existuje přímá závislost:

$$\log m = \log m_0 - Krt$$

m_0 je volná elektroforetická pohyblivost DNA

Krt je koeficient zpomalování, který závisí od vlastnosti gelu a i od tvaru dělených molekul, rozměru molekuly

Konformace DNA - superhelikální cirkulární, relaxovaná cirkulární a lineární formy DNA, migrují v agaróze s odlišnou rychlostí. Relativní mobilita tří forem DNA je závislá primárně na koncentraci a typu používané agarózy v gelu a dále na velikosti napětí, na iontové síle používaného pufru.

Existují tři hlavní třídy agaróz, 1) standardní

2) s nízkým bodem tání

3) intermediální.

V každé třídě existuje několik druhů, různě upravených agaróz, které jsou používány podle speciálních aplikací. Používané pufrů: TBE, TAE a TPE se liší v iontové síle a pufrovací schopnosti.

Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají velikostní markery známých molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí. Markery jsou připravené štěpením plazmidové nebo fágové DNA restrikcími endonukleázy (Šmarda a kol., 2005).

DNA se v gelu zviditelní pomocí barviva a po dokončení elektroforézy je tak možno identifikovat polohu separovaných molekul.

2.4.3 RFLP – Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restrikční analýza DNA je metodou charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleasami na fragmenty. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleas (asi 1500), které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různě krátké sekvence nukleotidů - 4, 6, 8 a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bazí a podle rozpoznané sekvence.

Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restrikčních fragmentů o určité opět reprodukovatelné délce (= počtu bazí). Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická. Některé restrikční endonukleasy jsou citlivé na metylaci DNA. V některých případech methylace adeninu a methylace cytosinu inhibují štěpení, v jiných je methylace pro štěpení nezbytná.

Odlišení různých DNA se provádí analýzou polymorfismu délky štěpných úseků. Tento polymorfismus vzniká na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Obecně restrikční endonukleasy, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restrikční endonukleasy rozpoznávající delší sekvenci štěpí méně často a na delší fragmenty.

Při neúplném (parciálním) štěpení DNA např. vlivem nevhodných reakčních podmínek vznikají delší úseky (například velký obsah bílkovin, nevhodná teplota, nedostatečná doba). Hvězdičkové štěpení (tzv. „*star*“ aktivita enzymu) je způsobeno nespecifickým štěpením mimo rozpoznávací místa. Vzniká tak mnoho krátkých úseků. Tento analyticky nepříznivý stav může být způsoben například nadbytkem glycerolu v reakci. Proto nelze zvyšovat koncentraci restrikčního enzymu v reakci zvyšováním použitého objemu, ale použitím stejného objemu enzymu ze zásoby o vyšší koncentraci (Lee a kol., 1998).

2.4.4 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy (restriktázy) jsou sekvenčně specifické bakteriální enzymy, které se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech nacházejících se uvnitř, nebo blízko rozpoznávací sekvence. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří skupin: endonukleázy typu I, II a III. Endonukleázy typu I a III nemají přesnou polohu štěpení vzhledem k rozpoznávací sekvenci a proto se běžně nepoužívají.

V molekulární genetice se používají endonukleázy typu II, které štěpí vždy ve stejném místě, které se nachází v rozpoznávací sekvenci, nebo v její těsné blízkosti. K rozštěpení molekuly DNA dochází hydrolyzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců.

Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět, nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické (palindrom). Je jich známo kolem 3000 a tvoří 250 různých restrikčních míst. Některé restrikční endonukleázy mohou mít i delší nebo degenerované rozpoznávací sekvence (rozpoznávají více různých nukleotidů).

Restrikční enzymy štěpí DNA dvěma způsoby:

- 1) rozštěpí obě vlákna ve stejném místě (tvoří tzv. tupé konce – blunt ends)
- 2) štěpí každé vlákno v jiné poloze (tvoří tzv. kohezní nebo-li lepidivé konce - sticky- ends).

Názvy restrikčních enzymů jsou odvozeny od jména bakterie, ze kterých byly získány, první písmeno z druhového jména, první dvě písmena z rodového jména a pořadové číslo (Kůdela a kol., 2002).

Bakteriální zdroj	Název restriktázy	Cílové místo štěpení
<i>Arthrobacter luteus</i>	<i>AluI</i>	5' - AG/CT 3'tupé konce
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HincII</i>	5' -A/AGCTT 3'koh.
<i>Moraxella sp.</i>	<i>MseI</i>	5' -T/TAA 3'koh.

3. Cíl práce

1. Molekulární charakterizace a zjištění diverzity izolátů fytoplazem proliferace jabloně (AP) infikující jabloně zejména v genofondech a produkčních výsadbách, popř. i ve výsadbách drobných pěstitelů a v planě rostoucích stromech v ČR.
2. Praktické zvládnutí molekulárních metod detekce, identifikace a charakterizace fytoplazem (PCR, RFLP).
3. Použití primerů pro proteiny PR2 a PR3 (např. primery AP8/AP10 a AP13/AP10) (Jarausch a kol., 2000) a primerů pro ribozomální protein rpAP15f/rpAP15r (Martini a kol., 2008).
4. Na základě PCR rozdělit vzorky na pozitivní a negativní.
5. Vyzkoušení různých primerů a jejich kombinací za účelem minimalizace falešně pozitivních reakcí při detekci fytoplazem.
6. Vyloučení nebo ověření přítomnosti a identifikace fytoplazem u pozitivních (falešně pozitivních) vzorků DNA pomocí RFLP.
7. Pro analýzu použít např. endonukleázy *SspI*, *MseI*, *RsaI*, *AluI*, *RcaI*, *DraI*, *HincII* a pod.
8. Pomocí RFLP by měly být určeny podtypy AP, AT-1, AT-2.

4. Materiál a metodika

Práce navazuje na již probíhající experimenty (studium a detekce 16S rDNA a ribozomálních proteinů AP) na pracovišti oddělení Rostlinné virologie BC AVČR, v. v. i., ÚMBR v Českých Budějovicích. Ke zjišťování fytoplazem proliferace jabloně a následného určování subtypů AT-1, AT-2 a AP, bylo celkem použito 78 vzorků DNA. V práci jsem pracovala již s vyizolovanou DNA (tabulka č. 1).

Větvičky z jabloní pro izolaci DNA byly odebrány v genofondech a v produkčních výsadbách, popř. i ve výsadbách drobných pěstitelů a v planě rostoucích stromech ČR. Celkem byly použity údaje za období r. 2001-2009, tj. za období 9 let.

4.1 PCR - Polymerázová řetězová reakce

(Polymerase Chain Reaction)

4.1.1 Průběh amplifikačních programů u jednotlivých primerů

PCR cyklus: Primery P1/P7, R16F1/R0, R16F2n/R2, R16F1/B6

94°C / 2 min. (94°C / 1 min. – 50°C / 2 min. – 72°C / 3 min.)
35x – 72°C / 10 min. (Schaff a kol., 1992);

Sekvence primerů:

P1: 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3'
(Deng a Hiruki, 1991); 1- 25bp

P7: 5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3' (Lorenz a kol., 1995);
1813 – 1831bp

R16F1: 5' - AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG - 3' (Lee a
Davis, 1992); 125-145bp

R16R0: 5' - GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C - 3' (Lee
a kol., 1992); 1471-1496bp (1326bp)

R16F2n: 5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (Lee a kol.,
1998); 144-164pb

R16R2: 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA ACC CCG 3' (Lee a
kol., 1992); 1365-1390bp (1201pb)

R16F1: 5' - AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG - 3' (Lee a
Davis, 1992); 125-145bp

R16B6: 5' -TAG TGC CAA GGC ATC CAC TGT G – 3' (Padovan
a kol., 1995); 1792-1814bp (1647bp)

PCR cyklus: Primery P1A/P7A

94°C / 1 min. (94°C / 1 min. – 55°C / 2 min. – 72°C / 3 min.)
35x – 72°C / 7 min. (Lee a kol., 1998);

Sekvence primerů:

P1A: 5' ACG CTG GCG GCG CGC CTA ATA C 3' (Lee a kol., 2004); 27-
49bp

P7A: 5' CCT TCA TCG GCT CTT AGT GC 3' (Lee a kol., 2004);
1808-1828bp (1759bp)

PCR cyklus: Primery AP5/AP4

94°C / 2 min. (95°C / 15s. – 55°C / 15s. – 72°C / 60s.)

35x – 72°C / 10 min. (Jarausch a kol., 2000);

Sekvence primerů:

AP5: 5' TCTTTTAATCTTCAACCATGGC 3' (Jarausch a kol., 2000); 560-581bp

AP4: 5' CCAATGTGTGAAATCTGTAG 3' (Jarausch a kol., 2000); 1042-1023bp

PCR cyklus: Primery AP8/AP10

94°C / 2 min. (95°C / 15s. – 58°C / 15s. – 72°C / 45s.)

35x – 72°C / 10 min. (Jarausch a kol., 2000);

Sekvence primerů:

AP8: 5' CAAACAACAATTTTAAAACC 3' (Jarausch a kol., 2000); 263-282bp

AP10: 5' TTTTCACAACGTATTCCGCC 3' (Jarausch a kol., 2000); 1798-1779bp

PCR cyklus: Primer AP13/AP10

94°C / 2 min. (95°C / 15s. – 55°C / 15s. – 72°C / 90s.)

35x – 72°C / 10 min. (Jarausch a kol., 2000);

Sekvence primerů:

AP13: 5' CTACAGATTTACACATTGG 3' (Jarausch a kol., 2000); 1023-1042bp

AP10: 5' TTTTCACAACGTATTCCGCC 3' (Jarausch a kol., 2000); 1798-1779bp

PCR cyklus: Primery rpAP15f/rpAP15r

94°C / 2 min. (94°C / 1 min. – 50°C / 2 min. – 72°C / 3 min.)

35x – 72°C / 10 min. (Schaff a kol., 1992);

Sekvence primerů:

rpAP15f: 5' AGT GCT GAA GCT AAT TTG G 3' (Martini a kol., 2008); 900 bp

rpAP15r: 5' TGC TTT TTA TAG CAA AAG GTT 3' (Martini a kol., 2008); 900 bp

Použitý cycler: Labnet International, Mini Cyclers.

Příprava reakční směsi PCR (PREMIX) pro jeden vzorek:

PPP Master mix	10,5ul
Primer 1	0,5ul
Primer 2	0,5ul
Strerilní destilovaná voda	12,5ul
DNA testovaná	1ul (20ng)
Celkem	25ul

Reakční směs byla připravena do celkového objemu 25ul. Do 12,5ul sterilní destilované vody bylo přidáno 10,5ul PPP Master mixu, 0,5ul primeru 1, 0,5ul primeru 2 a 1ul testované DNA. Tento poměr reagentů byl použit u direct PCR. Jediným rozdílem ve směsi u nested PCR je, že produkt z direct PCR byl naředěn v poměru 1 : 29 s ultračistou vodou +1ul DNA naamplifikované v direct PCR.

Amplifikované PCR fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Na 17 vzorků bylo použito 0,35g agarózy a 35ml 1x TBE. Směs byla dobře promíchána a přivedena k varu, po pomalém schlazení nalita do elektroforetické vaničky a po vhodné dobu ponechána utuhnout (cca 20 min.).

Do jamek gelu, ponořeného v adekvátním pufru (1x TBE) v elektroforéze, bylo pipetováno 6ul PCR vzorku + 0,5ul barvy SYBR Green (0,1% bromfenolová modř, 1ul 30% glycerínu, 200ul 10x TBE, 800ul H₂O), markeru (100bp) bylo použito 1,5ul a obarveno stejným množstvím barvy jako u vzorku.

Elektroforéza probíhala pod napětím 100V cca 25 minut. Výsledek byl zpracován dokumentačním systémem Biocapt.

Následně je uvedeno schéma provedení PCR.

4.1.2 Schéma provedení PCR

1) direct P1/P7 → nested F1/B6 → další nested F2n/R2

Izoláty DNA		
22/30	18/22	hybrid 195
2/82	12/16	hybrid 196
12/35	5/96	hybrid 201
12/27	13/21	Matčino
16/20	11/41	Reneta
21/14	12/2	Boskopské
11/22	2/54	Rubín
18/28	2/136	Jabloň 1
GII 13/40	GII 9/23	Jabloň 127
GII 19/19	hybrid 1	Starkinson
GII 20/8	hybrid 40	Zlatá renata
GII 8/45	hybrid 190	Redgauntlet
GII 6/20	hybrid 193	Přeštické růžové
E 11/30	E 1/5	Jabloň 125
Jabloň 126	Jabloň 206	Jabloň 208
Jabloň 212	Jabloň 213	Jabloň 216

2) direct P1A /P7A → nested F2n/R2

Izoláty DNA		
Jabloň 125	Jabloň 126	Jabloň 127
Jabloň 206	Jabloň 208	Jabloň 212
Jabloň 213	Jabloň 216	

3) direct F1/RO → nested F2n/R2

Izoláty DNA		
18/22	11/41	GII 8/45
12/16	G II 13/40	G II 6/20
5/96	G II 19/19	G II 9/23
13/21	G II 20/8	12/2
2/82		

4) direct AP5/AP4

Izoláty DNA		
18/22	G II 13/40	22/30
12/16	G II 19/19	2/82
5/96	G II 20/8	12/35
13/21	GII 8/45	12/27
11/41	G II 6/20	16/20
12/2	G II9/23	21/14
11/22	18/28	

5) direct AP8/AP10 → nested AP 13/AP10

Izoláty DNA		
18/22	G II 13/40	22/30
12/16	G II 19/19	2/82
5/96	G II 20/8	12/35
13/21	GII 8/45	12/27
11/41	G II 6/20	16/20
12/2	G II9/23	21/14
11/22	18/28	

6) direct rpAP15f/rpAP15r

Izoláty DNA		
22/30	18/22	hybrid 195
2/82	12/16	hybrid 196
12/35	5/96	hybrid 684
12/27	13/21	Matčino
16/20	11/41	Reneta
21/14	12/2	Boskopské
11/22	2/54	Rubín
18/28	2/136	Jabloň 1
GII 13/40	GII 9/23	Starkinson
GII 19/19	hybrid 1	Zlatá renata
GII 20/8	hybrid 40	Redgauntlet
GII 8/45	hybrid 87	Přeštické růžové
15/75	E 11/1	Ferrari
9/19	E 1/5	Honey
3/55	E 11/60	Průsvitné letní
9/3	E 1/17	Zvonkové
10/9	hybrid 201	Golden
10/28	hybrid 208	Boršov
8/70	hybrid 226	Ontario
9/48	hybrid 296	Idared
12/148	hybrid 193	Julie
1/191	GII 6/20	Angold
G 11/52	James G.	hybrid 190

4.2 RFLP – Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů

(Restriction Fragment Length Polymorphism)

K restrikčnímu štěpení byla využita řada restrikčních enzymů, jejich výběr byl závislý na primerech použitých v předešlé PCR viz. následující schéma.

PCR: direct **P1/P7** → nested **F1/B6** → další nested **F2n/R2** →
RFLP: *MseI*

PCR: direct **P1A/P7A** → nested **F2n/R2** → RFLP: *MseI*

PCR: direct **AP8/AP10** → nested **AP 13/AP10** → RFLP: *RcaI, HincII*

PCR: direct **rpAP15f/rpAP15r** → RFLP: *AluI*

Příprava reakční směsi pro štěpení PCR produktu restrikčními endonukleázami

Nejdříve byl podle počtu vzorků a zvoleného objemu reakce připraven tzv. „PREMIX“ výpočet např. pro 1 vzorek.

Pufr	3ul
BSA	2ul
Restrikční endonukleáza	0,5ul
Sterilní voda	dopočítat do celkového objemu 15ul
PCR produkt	2 – 8ul

PREMIX byl připraven pro každou restrikční endonukleázu samostatně podle (tabulka č. 2). Připravený premix v 1,5ml epi je důkladně promíchán, stočen na minicentrifuze a rozpipetován do 1,5ml epi. K premixu je přidáno 2 - 8ul vzorku DNA (dle síly bandu), promícháno a potom stočeno na mini-centrifuze. 1,5ml epi inkubujeme 24 hod. při 37 C° v termobloku.

Pro elektroforetickou analýzu produktů restrikčního štěpení byl použit 8 % akrylamidový gel ve složení: 6ml sterilní H₂O; 837,5μl 10x TBE; 1,75ml (N, N'- methylenbisakrylamid, roztok 29:1, AA); 129,1μl amonium persulfátu (APS); 5μl TMD (N, N', N' tetramethylethylendiamin). Směs byla dobře promíchána a rychle převedena do formy na gel. Gel byl ponechán tuhnout cca. 15 minut.

Do jamek gelu, ponořeného v adekvátním pufru (1xTBE) ve vertikální elektroforéze, byla pipetována směs 4 μ l barvy (Blue/Orange) + DNA vzorek. Markeru (100bp) bylo použito 1,5 μ l a obarveno stejným množstvím barvy jako u vzorku.

Elektroforéza probíhala pod napětím 120V cca 90 minut. Po skončení elektroforézy byl gel obarven pomocí Gel Redu (50ml destilované vody, 15 μ l Gel Redu) za 15 minut. Po obarvení byl gel vyfocen.

5. Výsledky a diskuse

5.1. Následná nested PCR s primery P1/P7 -> F1/B6 -> F2n/R2

Direct PCR s primery P1/P7, nested PCR s primery F1/B6 a následná nested PCR s primery F2n/R2 byla použita u vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 2/54, 2/136, E 1/5, E 11/60, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 201, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Jabloň1, Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216, Starkinson, Zlatá renata, Redgauntlet, Přeštické růžové (tabulka č. 3, 4).

Direct PCR s primery P1/P7 s jedním opakováním byla použita u vzorků 2/54, E 1/5, E 11/60, 2/136, Jabloň1, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Zlatá renata, Redgauntlet, Přeštické růžové, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 201 a vyšla s negativním výsledkem (tabulka č. 3) a u vzorků Jabloň 125, Jabloň 206, Jabloň 208 vyšla s pozitivním výsledkem (tabulka č. 3). U vzorků 22/30, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, GII13/40, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, Starkinson bylo provedeno dvojí opakování s negativním výsledkem (tabulka č. 3) a u vzorků 2/82, GII19/19, GII20/8 bylo provedeno trojí opakování s negativním výsledkem (tabulka č. 3).

Nested PCR s primery F1/B6 s jedním opakováním byla použit u vzorků 2/54, E 1/5, E 11/60, 2/136, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Jabloň1, Jabloň 212, Starkinson, Zlatá renata, Redgauntlet, Přeštické růžové, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 201 a vyšla s negativním výsledkem (tabulka č. 4) a u vzorků Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 213, Jabloň 216 a vyšla s pozitivním výsledkem (tabulka č. 4). Dvojí opakování bylo použito u vzorků 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2 a vyšlo s negativním výsledkem a u vzorků 22/30, 12/35 vyšlo první opakování s negativním výsledkem a druhé opakování vyšlo s pozitivním výsledkem (tabulka č. 4). U vzorku 2/82 vyšla první dvě opakování s negativním výsledkem a třetí opakování s pozitivním výsledkem a u vzorku GII20/8 vyšla první tři opakování negativně a čtvrté opakování vyšlo pozitivně (tabulka č. 4).

Následná nested PCR s primery F2n/R2 byla použita u vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28 GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 2/54, 2/136, E 1/5, E 11/60, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Jabloň1, Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216, Starkinson, Zlatá reneta, Redgauntlet, Přeštické růžové, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 201 (tabulka č. 4).

Následná nested PCR s primery F2n/R2 s jedním opakováním byla použita u vzorků 2/54, E 11/60, Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 213, Jabloň 216, Reneta, Boskopské, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 201, vyšla s pozitivním výsledkem a u vzorků E 1/5, 2/136, Matčino, Rubín, Jabloň1, Jabloň 212, Starkinson, Zlatá reneta, Redgauntlet, Přeštické růžové, hybrid 1 vyšla s negativním výsledkem (tabulka č. 4). Následná nested PCR s primery F2n/R2 s dvojím opakováním byla použita u vzorků 12/35, 5/96 s pozitivním výsledkem, u vzorků 18/28, GII13/40, 12/16, 13/21 vyšla s negativním výsledkem a u vzorků 22/30, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, GII19/19, GII8/45, GII6/20, GII9/23, 18/22, 11/41, 12/2 vyšlo první opakování s negativním výsledkem a druhé opakování s pozitivním výsledkem (tabulka č. 4). U vzorku 2/82 vyšla první dvě opakování negativně a třetí opakování pozitivně, u vzorku GII20/8 vyšla první dvě opakování negativně a druhé dvě opakování pozitivně (tabulka č. 4).

5.2. Následná nested PCR s primery P1A/P7A -> F2n/R2

Direct PCR s primery P1A/P7A, nested PCR s primery F2n/R2 byla použita u vzorků Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216 (tabulka č. 3, 4).

Direct PCR s primery P1A/P7A s jedním opakováním byla použita u vzorků Jabloň 126, Jabloň 216 a vyšla s negativním výsledkem (tabulka č. 3) a u vzorků Jabloň 125, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213 vyšla s pozitivním výsledkem (tabulka č. 3).

Nested PCR s primery F2n/R2 s jedním opakováním byla použit u vzorků Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216 a vyšla s pozitivním výsledkem (tabulka č. 4) a u vzorku Jabloň 127 vyšla s negativním výsledkem (tabulka č. 4).

5.3. Nested PCR s primery F1/R0 -> F2n/R2

Direct PCR s primery F1/R0, nested s primery F2n/R2 byl použit u vzorků 2/82, 12/16, 5/96, 11/41, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII8/45, GII6/20, GII9/23, 18/22, 13/21, 12/2 s jedním opakováním a vyšel negativně (tabulka č. 3, 4).

5.4. Direct PCR s primery AP5/AP4

Direct PCR s primery AP5/AP4, byl použit u vzorků 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 11 /22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14 s jedním opakováním a vyšlo s pozitivním výsledkem (tabulka č. 3).

5.5. Nested PCR s primery AP8/AP10 -> AP13/AP10

Direct PCR s primery AP8/AP10, nested PCR s primery AP13/AP10 byl použit u vzorků 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 11 /22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14 (tabulka č. 3).

Direct PCR s primery AP8/AP10, byl použit u všech vzorků s dvojitým opakováním, vyšel s negativním výsledkem (tabulka č. 3). Nested PCR s primery AP13/AP10 byl použit u vzorků pouze jednou a vyšel s pozitivním výsledkem (tabulka č. 4, foto č. 6).

5.6. Direct PCR s primery rpAP15f/rpAP15r

Direct PCR s primery rpAP15f/rpAP15r byl použit u vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 2/54, 2/136, E1/5, E11/60, 8/70, 9/48, 15/75, G11/52, 12/148, 10/28, E1/17, E11/1, 10/9, 9/19, 3/55, 9/3, 1/191, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 684, hybrid 87, hybrid 208, hybrid 201, hybrid 296, hybrid 226, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Jabloň1, Starkinson, Zlatá reneta, Redgauntlet, Přeštické růžové, Idared, Angold, James G., Julie, Ferrari, Honey, Boršov, Ontario, Průsvitné letní, Zvonkové, Golden, (tabulka č. 3, foto č. 7).

Direct PCR s primery rpAP15f/rpAP15r s jedním opakováním byl použit u vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 2/54, E1/5, E11/60, Boskopské, Jabloň1, Golden, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 193, hybrid 196, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 684, hybrid 87, hybrid 226, hybrid 208, hybrid 201, vyšla s pozitivním výsledkem a vzorky 8/70, 9/48, 15/75, G11/52, 12/148, 10/28, E1/17, E11/1, 10/9, 9/19, 3/55, 9/3, Matčino, Přestické růžové, Idared, Angold, James G., Julie, Zlatá reneta, Redgauntlet, Ferrari, Honey, Průsvitné letní, Zvonkové, hybrid 1, hybrid 296 vyšly s negativním výsledkem (tabulka č. 3).

Dvojí opakování bylo provedeno u vzorků 2/136, 1/191, Starkinson, Boršov s negativním výsledkem a u vzorků Reneta, Ontario s pozitivním výsledkem. U vzorku Rubín vyšly tři opakování s negativním výsledkem (tabulka č. 3).

5.7. Vytvoření standardních RFLP profilů vzorků fytoplazem

Výsledkem restričního štěpení (RFLP) enzymem *MseI* po amplifikaci DNA pomocí primerů F2n/R2 vznikl charakteristický profil pro fytoplazmu proliferace jabloně ('*Candidatus* Phytoplasma mali', ribozomální podskupina 16SrX – A).

Tímto postupem lze odlišit fytoplazmy různých ribozomálních skupin i podskupin (Lee a kol., 1998), nelze však určit podskupiny fytoplazmy proliferace jabloně AP či AT.

Štěpení restriční endonukleázou *MseI* bylo použito u následujících vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 5/96, 11/41, 12/2, 2/54, E11/60, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 40, hybrid 201, Jabloň 125, Jabloň 126, Jabloň 127, Jabloň 206, Jabloň 208, Jabloň 212, Jabloň 213, Jabloň 216, Reneta, Boskopské, které vyšly v nested a následném nested PCR s primery F2n/R2 s pozitivním signálem (tabulka č. 4).

Restriční štěpení enzymem *MseI* je dokumentováno v (tabulce č. 5, 6 a foto č. 8). U vzorku Jabloň 127 při restričním štěpení enzymem *MseI* při velikosti fragmentu >50 vyšly tři proužky. Rozdíl zjistíme následným sekvenováním.

Martini a kol., (2008) ve své práci pro detekci fytoplazem proliferace jabloně používá amplifikaci DNA – direct PCR s primery P1/P7, nested PCR s primery F1/B6, následná nested PCR s primery F2n/R2.

Následné enzymatické štěpení enzymy *RsaI*, *SspI* ukazuje shodný restriční profil fytoplazmy proliferace jabloně podskupiny AP a AT (příloha č. 3, obrázek č. 1).

Po amplifikaci DNA – direct PCR primery AP8/AP10, nested PCR primery AP13/AP10 a následném enzymatickém štěpení enzymy *RcaI*, *HincII* při dodržení PCR cyklu 95°C / 1 min. (94°C / 1min. – 53°C / 45s. –

72°C / 1min.) 45x – 72°C / 8 min. se měly vzorky rozdělit na podskupiny AP, AT a podtypy AT-1, AT-2 (Martini a kol., 2008), (příloha č. 3- obrázek č. 1, tabulka č. 6). Amplifikace našich vzorků 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 18/28, G13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 5/96, 11/41, 12/2,12/16, 13/21 tímto způsobem byla problematická (tabulka č. 6). Často vznikaly nespecifické produkty (foto č. 6). Následné restriční štěpení bylo velmi obtížně odpovědně vyhodnotit.

Pomocí direct PCR s primery pro ribozomální protein rpAP15f/ rpAP15r a následným enzymatickým štěpením enzymem *AluI* byl získán restriční profil typický pro fytoplazmu proliferace jabloně subtypu AP u 34 vzorků 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 27/30, GII13/40, GII19/19, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 2/54, E1/5, E11/60, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 684, hybrid 87, hybrid 201, hybrid 226, Reneta, Boskopské, Jabloň1, Ontario, Golden (tabulka č. 6) a subtypu AT u 5 vzorků 22/30, 18/28, GII20/8, 12/2, hybrid 208 (tabulka č. 6) ze 70 izolátů DNA jabloní 22/30, 2/82, 12/35, 12/27, 16/20, 21/14, 11/22, 27/30, 18/28, GII13/40, GII19/19, GII20/8, GII6/20, GII8/45, GII9/23, 18/22, 12/16, 5/96, 13/21, 11/41, 12/2, 2/54, 2/136, E1/5, E11/60, 8/70, 9/48, 15/75, G11/52, 12/148, 10/28, E1/17, E11/1, 10/9, 9/19, 3/55, 9/3, 1/191, hybrid 1, hybrid 40, hybrid 190, hybrid 193, hybrid 195, hybrid 196, hybrid 684, hybrid 87, hybrid 208, hybrid 201, hybrid 296, hybrid 226, Matčino, Reneta, Boskopské, Rubín, Jabloň1, Starkinson, Zlatá reneta, Redgauntlet, Přeštické růžové, Idared, Angold, James G., Julie, Ferrari, Honey, Boršov, Ontario, Průsvitné letní, Zvonkové, Golden (tabulka č. 1). Restriční štěpení enzymem *AluI* je dokumentováno v tabulce č. 5, 6, foto č. 9.

Martini a kol., (2008) ve své práci pro detekci fytoplazem proliferace jabloně používá amplifikaci DNA – direct PCR s primery rpAP15f/ rpAP15r. Následné enzymatické štěpení enzymy *AluI* ukazuje shodný restriční profil fytoplazmy proliferace jabloně podskupiny AP (rp X - A), AT-1 (rp X – B), (příloha č. 3, obrázek č. 1).

6. Závěr

1. Pro detekci fytoplazem není samotné PCR bez následné analýzy amplifikovaného fragmentu DNA dostatečně spolehlivou metodou.
2. Provedené experimenty naznačují, že pro spolehlivou detekci fytoplazmy proliferace jabloně jsou vhodné primery rpAP15f/rpAP15r.
3. Provedené experimenty naznačují, že primery P1A/P7A jsou vhodnější než primery P1/P7 pro direct PCR.
4. Použitím direct PCR, nested PCR a následné nested PCR byly vzorky jabloní rozděleny na pozitivní a negativní. Celkem bylo testováno 78 vzorků DNA, z toho bylo 48 vzorků pozitivních.
5. Výsledkem restričního štěpení (RFLP) enzymem *MseI* po amplifikaci DNA pomocí primerů F2n/R2 vznikl charakteristický profil pro fytoplazmu proliferace jabloně ('*Candidatus* Phytoplasma mali', ribozomální podskupina 16Sr X – A) u 34 vzorků ze 78 testovaných vzorků, nelze však určit podskupiny fytoplazmy proliferace jabloně AP či AT.
6. Restričním štěpením (RFLP) enzymy *RcaI*, *HincII* po amplifikaci DNA pomocí primerů AP13/AP10 se měly vzorky rozdělit na podskupiny AP, AT a podtypy AT-1, AT-2. Amplifikace našich vzorků tímto způsobem byla problematická, často vznikaly nespecifické produkty a následné restriční štěpení bylo velmi obtížné odpovědně vyhodnotit.
7. Enzymatickým štěpením enzymem *AluI* po amplifikaci primery rpAP15f/ rpAP15r byl získán restriční profil typický pro fytoplazmu proliferace jabloně subtypu AP - rp X-A u 34 vzorků a subtypu AT - 1 rp X-B u 5 vzorků ze 78 DNA izolátů jabloní.
8. U 39 DNA izolátů jabloní pocházejících zejména z genofondů a produkčních výsadeb, popř. i z výsadeb drobných pěstitelů a z planě rostoucích stromů v ČR, se nám nepodařilo molekulárními metodami prokázat infekci, která způsobuje příznaky onemocnění fytoplazmy proliferace jabloně.

7. Seznam použité literatury

- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Arazone, A.** (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol Bio* **6**, 115-121.
- Banttari, EE., Zeyen, RJ.** (1979): Interactions of mycoplasma-like organisms and viruses in dually infected leafhoppers, planthoppers, and plants. *See. Ref. 115a*, pp. 327-347.
- Bertaccini, A., Paltrinieri S., Martini M., Fisichella M., Ermacora P., Fontaneri M., De Salvador R.** (2006): Comparison of different detection systems for apple proliferation phytoplasmas in Trentino (North Italy). XXth International Symposium on Virus and Virus – like Diseases of Temperate Fruit Crops and XIth International Symposium on Small Fruit virus Diseases. Antalya, Turkey, May 22-26, p. 124.
- Bertaccini, A.** (2007): Phytoplasmas: Diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* **12**, 673 -689.
- Brčák, J.** (1979): Leafhopper and planthopper vector of plant disease agents in central and southern Europe. *See. Ref. 115a*, pp. 97-1454.
- Čermák, V., Lauterer, P.** (2006): Mery – vektory fytoplazem clusteru AP. In: Sborník abstraktů XVII. České a Slovenské konference o ochraně rostlin, 12. -14. září 2006, Praha, 110-111.
- Čermák, V., Lauterer, P.** (2007): Overwintering of psyllids (Hemiptera: Psylloidea) in South Moravia (Czech Republic) with respect to the apple proliferation cluster phytoplasmas. In: Book of abstracts of 4th European Hemiptera Congress, 10-14 September, 2007, Ivrea Turin, Italy, 105-106.
- Čermák, V., Lauterer, P.** (2008): Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect to the vectors of apple proliferation cluster phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* **61**, 147-148.
- Deng, S., Hiruki, C.** (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Mikrob. Methods* **14**, 53 - 61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H.** (1967): Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches' broom, aster yellows or Paulownia witch's broom. *Ann Phytopathol. Soc. Japan* **33**, 259- 266.

- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Válová, P.** (2006): Molekulární diagnostika fytoplazmy proliferace jabloně u hmyzích vektorů v jabloňových sadech České republiky. In: Sborník abstraktů XVII. České a Slovenské konference o ochraně rostlin, 12. -14. září 2006, Praha, 164.
- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Navrkalová, V.** (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). *Bulletin of Insectology* **60**, 183-184.
- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Válová, P.** (2008): Molecular tests to determine apple proliferation phytoplasma presence in psyllid vectors from apple tree orchards in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* **781**, 471-475.
- Grylls, NE.** (1979): Leafhopper vector and the plant disease agents they transit in Australia. *See. Ref. 115a*, pp. 179-213.
- Ho, K., Tsai, C., Chung, T.** (2001): Organisation of ribosomal RNA genes from a loofah withes broom phytoplasma. *DNA & Cell Biology*. **20**, 115-122.
- Jaraus, W., Saillard C., Heliot B., Garnier M., Dosba F.** (2000): Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR- RFLP and sequencing of a non- ribosomal fragment. *Mol. Cell. Probes* **14**, 17-24.
- Kůdela, V., Nováček, A., Fucík, L.** (2002): Rostlinolékařská bakteriologie. Academia. pp. 1. vydání Praha, Academia, ISBN 80-200-0899-3, 28- 347.
- Kuske, CR., Kirkpatrick, BC.** (1992): Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int.J. Syst.Bacteriol.* **42**, 226-233.
- Lee, IM., Davis, RE.** (1992): Mycoplasma which infect plant and insects. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, ed. J. Maniloff, Finch LR, Varsman, JB, pp. 379-399. Washington, DC: Am.Soc.Microbiol.
- Lee, IM., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, DE.** (1995): Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. – *Phytopathology* **85**, 728-735.
- Lee, IM. a kol.,** (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1153-1169.

Lee, IM., Gundersen – Rindal, DE., Davis, RE., Bittner, KD., Marcone, C., Seemüller, E. (2004): „ Candidatus phytoplasma Asteris“ , a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and diseases. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **54**, 1037 – 1048.

Lim, PO., Sears, BB. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* **171**, 5901-5906.

Lorenz, KH., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E. (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* **85**, 771-776.

Martini M., Paltrinieri S., Fisichella M., Ermacora P., Fontaneri M., De Salvador R. (2008): Comparison of different detection systems for apple proliferation phytoplasmas in Trentino (North Italy). *Acta Horticulturae* **781**, 453-457.

McCoy, RE., Caudwell, A., Chang, CJ., Chen, T., et. al. (1984): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *The mycoplasmas, ed. RF Whitcomb, JG, Tully*, **5**, 545-560. New York: Academic.

Navrátil, M., Fialová, R. (2008): Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost a Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 156.

Padovan, AC., Gibb, KS., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, RE., Magarey, PA., Sears BB. (1995): Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian J. Grape wine Res.* **1**, 25-31.

Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., Osler, R. (1998): Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios.* **95**, 13-23.

Schaff, DA., Lee, IM., Davis, RE. (1992) Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1503-1509.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., et al. (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno, ISBN 978-80-210-3841-7, 188.

Tsai, JH. (1979): Vector transmission of mycoplasma agent of plant diseases. *The Mycoplasmas, ed RF Whitcomb, JG, Tully*, **3**, 265-307. New York: Academic.

Weisburg, WG., Tully, JG., Rose, DL., Petzel, JP., et.al. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasma : basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**, 6455-6467.

8. Seznam příloh

1. Tabulková příloha

2. Obrazová příloha

„Následuje pasáž o rozsahu 39- 56 strana, obsahuje utajené skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále bakalářské práce uloženém na zemědělské fakultě JU.“