

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Barbara Nardelliová

Název práce: Molekulárně-biologická charakteristika fytoplazem ze skupiny žloutenky jilmu (16SrV) infikujících plevelu na jižní Moravě

Typ práce (bakalářská, diplomová): bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

Fytoplazmy jsou bakteriální paraziti způsobující mnoho ekonomicky významných rostlinných chorob. Rostliny jsou infikovány prostřednictvím hmyzích vektorů. Fytoplazmy, jakož to intrabuněční paraziti, osídlují sítkovice rostlin a zabraňují tak transportu živin, což způsobuje vznik různých symptomů u rostlin. Vývoj taxonomie fytoplazem významně posunulo využití konzervovaného ribozomálního genu 16S rRNA při molekulárních analýzách.

Cílem práce bylo charakterizovat a identifikovat fytoplazmy napadající plevelu na jižní Moravě se zaměřením na skupinu žloutenky jilmu (16SrV). Druhy skupiny 16SrV jsou rozšířeny především v severní Americe a Evropě. Infikují hlavně dřeviny, případně keře, u kterých způsobují žloutenku a odumírání. Hlavním zástupcem skupiny je druh 'Candidatus Phytoplasma ulmi', který infikuje zejména jilmy. Za hlavní vektor v Evropě se považuje *Macropsis mendax*, v Severní Americe je to *Scaphoideus luteolus*.

V experimentální části práce byly pomocí molekulárních metod analyzovány dva vzorky DNA izolované z pcháče osetu (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis* L.). Výsledky získané sekvencováním úseku R16F2/R16R2 sekvence genu 16S rRNA potvrdily přítomnost fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali' (16SrX-A) u vzorku z pcháče a 'Candidatus Phytoplasma solani' (16SrXII-A) u vzorku ze svlačce.

Klíčová slova: Fytoplazmy, Elm yellows phytoplasma, pcháč oset, *Cirsium arvense*, 16S rDNA

Počet stran: 55

Počet příloh: 5

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname : Romana Pospíchalová

Title: Molecular and biological characterization of phytoplasmas from Elm yellows group (16SrV) infecting weeds of south Moravia

Type of thesis (bachelor, master): bachelor

Department: Department of cell biology and genetics

Supervisor: RNDr. Pavla Válová

The year of presentation: 2012

Abstract:

Phytoplasmas are bacterial parasites causing many economically important plant diseases. Plants are infected by insect vectors. Phytoplasmas, intracellular parasites, inhabit sieve tubes in plants and prevent the transport of nutrients, causing the formation of different symptoms in plants. Development of phytoplasmas taxonomy shifted the use of conserved ribosomal 16S rRNA gene for molecular analyzes significantly.

The aim was characterization and identification of phytoplasmas infecting weeds in south Moravia, focusing on a group of elm yellows (16SrV). Types of groups 16SrV are spread mainly in North America and Europe. They infect mainly trees or shrubs, for which they cause yellows and death. The main representative of the group is a kind of '*Candidatus phytoplasma ulmi*', which mainly infects elms. *Macropsis mendax* is considered as the main vector in Europe, *Scaphoideus luteolus* in the North America.

In the experimental part of this work two samples of DNA isolated from creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) and bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) were analyzed by molecular methods. The results obtained by sequencing section R16F2/R16R2 16S rRNA gene sequences confirmed the presence of phytoplasma '*Candidatus phytoplasma mali*' (16SrX-A) in the sample of the creeping thistle and '*Candidatus phytoplasma solani*' (16SrXII-A) in the sample of the convulvulus.

Keywords: Phytoplasmas, Elm yellows phytoplasma, *Cirsium arvense*, 16S rDNA

Number of pages: 55

Number of appendices: 5

Language: Czech

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

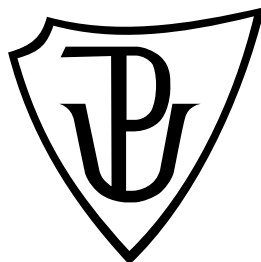
Olomouc 2012

Barbara Nardelliová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně-biologická charakteristika fytoplazem
ze skupiny žloutenky jilmu (16SrV) infikujících plevelu
na jižní Moravě**

Bakalářská práce

Barbara Nardellová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavly Válové na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP Olomouc a že jsem pro její vypracování použila všechny uvedené zdroje.

V Olomouci dne:

.....

Tímto chci poděkovat své školitelce doktorce Pavle Válové za odborné vedení mé bakalářské práce a pomoc při získání a zpracování výsledků experimentální části mé práce, zároveň bych chtěla poděkovat také prof. Milanu Navrátilovi a Mgr. Daně Šafářové za pomoc při práci v laboratoři.

Souhrn

Fytoplazmy jsou bakteriální paraziti způsobující mnoho ekonomicky významných rostlinných chorob. Rostliny jsou infikovány prostřednictvím hmyzích vektorů. Fytoplazmy, jakožto intrabuněční paraziti, osídlují sítkovice rostlin a zabraňují tak transportu živin, což způsobuje vznik různých symptomů u rostlin. Vývoj taxonomie fytoplazem významně posunulo využití konzervovaného ribozomálního genu 16S rRNA při molekulárních analýzách.

Cílem práce bylo charakterizovat a identifikovat fytoplazmy napadající plevele na jižní Moravě se zaměřením na skupinu žloutenky jilmu (16SrV). Druhy skupiny 16SrV jsou rozšířeny především v severní Americe a Evropě. Infikují hlavně dřeviny, případně keře, u kterých způsobují žloutenku a odumírání. Hlavním zástupcem skupiny je druh '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', který infikuje zejména jilmy. Za hlavní vektor v Evropě se považuje *Macropsis mendax*, v Severní Americe je to *Scaphoideus luteolus*.

V experimentální části práce byly pomocí molekulárních metod analyzovány dva vzorky DNA izolované z pcháče osetu (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis* L.). Výsledky získané sekvencováním úseku R16F2/R16R2 sekvence genu 16S rRNA potvrdily přítomnost fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' (16SrX-A) u vzorku z pcháče a '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16SrXII-A) u vzorku ze svlačce.

Summary

Phytoplasmas are bacterial parasites causing many economically important plant diseases. Plants are infected by insect vectors. Phytoplasmas, intracellular parasites, inhabit sieve tubes in plants and prevent the transport of nutrients, causing the formation of different symptoms in plants. Development of phytoplasmas taxonomy shifted the use of conserved ribosomal 16S rRNA gene for molecular analyzes significantly.

The aim was characterization and identification of phytoplasmas infecting weeds in south Moravia, focusing on a group of elm yellows (16SrV). Types of groups 16SrV are spread mainly in North America and Europe. They infect mainly trees or shrubs, for which they cause yellows and death. The main representative of the group is a kind of '*Candidatus phytoplasma ulmi*', which mainly infects elms. *Macropsis mendax* is considered as the main vector in Europe, *Scaphoideus luteolus* in the North America.

In the experimental part of this work two samples of DNA isolated from creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) and bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) were analyzed by molecular methods. The results obtained by sequencing section R16F2/R16R2 16S rRNA gene sequences confirmed the presence of phytoplasma '*Candidatus phytoplasma mali*' (16SrX-A) in the sample of the creeping thistle and '*Candidatus phytoplasma solani*' (16SrXII-A) in the sample of the convolvulus.

Obsah

1. Cíle práce.....	7
2. Úvod.....	8
3. Literární přehled.....	10
3.1 Fytoplazmy jako patogen.....	10
3.2.1 Metody studia.....	11
3.2.2 Genom fytoplazem.....	11
3.2 Skupina Elm yellows (EY).....	13
3.2.1 Elm yellows.....	14
3.2.2 Variabilita fytoplazem skupiny Elm yellows (16SrV).....	15
3.2.3 Přehled dalších druhů fytoplazem skupiny Elm yellows (16SrV).....	19
3.2.3.1 Jujube witches'-broom.....	19
3.2.3.2 Alder yellows.....	19
3.2.3.3 Flavescence dorée.....	20
3.2.3.4 Rubus stunt (witches'-broom phytoplasma disease).....	20
3.3 Výskyt fytoplazem v ČR.....	21
4. Materiál a metody.....	23
4.1 Biologický materiál.....	23
4.2 Izolace DNA.....	24
4.3 Příprava DNA vzorků pro PCR analýzu.....	24
4.4 Polymerázová řetězová reakce.....	24
4.4.1 Gelová elektroforéza.....	26
4.5 Izolace PCR-produktů.....	26
4.6 Klonování PCR-produktů.....	27
4.6.1 Ligace DNA do plazmidu.....	27
4.6.2 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	28
4.6.3 Test bakteriálních kolonií pomocí 'colony' PCR reakce.....	29
4.6.4 Příprava bakteriální konzerv.....	30
4.6.5 Izolace produktů M13f/M13r.....	30
4.7 Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů produktů PCR.....	30
4.8 Sekvencování.....	31
4.8.1 Příprava sekvenační směsi.....	31
4.9 Identifikace a fylogenetická analýza izolátů.....	32
5. Výsledky.....	33
6. Diskuse.....	41
7. Závěr.....	43
8. Seznam použité literatury.....	44
9. Seznam použitých zkratk.....	49
10. Přílohy.....	50

1. Cíle práce

Cílem předložené bakalářské práce bylo:

- Shromáždění dostupné literatury a vypracování literární rešerše na téma molekulárně-biologická charakteristika fytoplazem ze skupiny žloutenky jilmu (16SrV) infikujících plevelů na jižní Moravě.
- Molekulární analýza fytoplazmové DNA vybraných izolátů fytoplazem z plevelů - amplifikace vybraných segmentů 16S rDNA (16SrV), jejich multiplikace v pGEM-T plazmidu a sekvencování (ABI PRISM 3730).
- Fylogenetická analýza parciálních sekvencí 16S rDNA fytoplazem ze skupiny Elm yellows (16SrV) z GenBank a sekvencí získaných z plevelů během experimentální části práce (BLAST, iPhyClassifier, MEGA).

2. Úvod

Předložená bakalářská práce se v teoretické části zabývá biologicko-molekulární charakteristikou fytoplazem žloutenky jilmu (EY) vyskytujících se na plevelích na jižní Moravě a jejich identifikací dle dostupných detekčních metod.

Fytoplazmy, dříve (nesprávně) označované jako Mycoplasma-like organisms (MLOs), byly poprvé objeveny ve floému rostlin vykazujících žloutenky v roce 1967 (Doi *et al.*, 1967). Při transmisní elektronové mikroskopii se jeví jako kulaté až vláknité buňky o průměru 200-800 nm (IRPCM, 2004). Buněčné membrány fytoplazem '*Candidatus*' jsou odolné vůči digitoninu a citlivé na hypotonické solné roztoky (Lim *et al.*, 1992). Přežívají a množí se pouze v hypertonickém prostředí. Mohou se množit pučením, přehrádečným dělením a fragmentací vláken (Seemüller *et al.*, 2004).

Jedná se o prokaryotní, intrabuněčné, nehelikální parazity žijící v sítkovicích floému rostlin a tkáních hmyzích vektorů, kde přežívají a zároveň se množí. Řadíme je do oddělení *Tenericutes*, do třídy *Mollicutes*, rodu *Phytoplasma* (Schneider *et al.*, 1993). Na rozdíl od jiných bakterií jejich buňky postrádají pevnou buněčnou stěnu a jsou obaleny pouze jednotkovou plazmatickou membránou. Tyto fytopatogenní, grampozitivní, obligátní bakterie způsobují několik stovek ekonomicky významných rostlinných chorob, vyskytují se po celém světě a zaujímají rozmanité ekologické niky. Jejich negativní působení má velký dopad na pěstování kulturních plodin, protože způsobují znatelné poklesy kvality a množství úrody.

Studium fytoplazem ztěžují jejich specifické životní nároky, které neumožňují kultivaci *in vitro*, nelze je přenášet mechanicky rostlinou „šťávou“ ani semenem. Přenos je možný jedině charakteristickými hmyzími vektory, parazitickými rostlinami (pomocí haustorií) a vegetativními částmi rostlin. Infekce se projevuje rozličnými příznaky, jako např. chloróza, proliferace, virescence, deformace listů, celková zakrslost rostliny.

Nejrozšířenější detekce a identifikace fytoplazem je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR), na délkovém polymorfismu restričních fragmentů (RFLP analýza) a na sekvencování vybraných úseků fytoplazmové DNA. Výše jmenované molekulární metody byly použity i v této práci k analýze izolátů fytoplazem z plevelů, rostoucích na jižní Moravě, včetně fylogenetické analýzy parciálních sekvencí ribozomální 16S rDNA a použití specializovaného software iPhyClassifier.

Na území České republiky probíhá od roku 1995 výzkum zabývající se detekcí, identifikací a epidemiologickými aspekty fytoplazem v různých hostitelských rostlinách, včetně plevelů. Bakalářská práce Flídra (2010) naznačila přítomnost fytoplazmy elm yellows

ve vzorcích plevelů z jižní Moravy. Předložená práce má proto za cíl shromáždit informace o výskytu a molekulární variabilitě fytoplazem skupiny Elm yellows (16SrV) a dále pomocí molekulárních metod detekovat a identifikovat fytoplazmy ve vybraných vzorcích plevelů, vykazujících symptomy napadení fytoplazmou, a rozšířit tak poznatky o výskytu fytoplazem na Českém území.

3. Literární přehled

3.1. Fytoplazmy jako patogeny

Triviální název „fytoplazma“ byl přijat jako společný název pro nehelikální prokaryota bez buněčné stěny, která osídlují floém rostlin a tkáň hmyzích vektorů.

Důkaz, že některé rostlinné choroby jsou spojeny s kolonizací prokaryot ve floému, které se morfologicky podobají mykoplazmatům, byl poprvé podán v práci Doi *et al.* (1967). Do roku 1967 byl však tento patogen považován za virus, protože jej nebylo možné kultivovat a prošel bakteriálním filtrem (Doi *et al.*, 1967). Od té doby bylo s těmito organismy spojeno již několik set rostlinných chorob (McCoy *et al.*, 1989; Seemüller *et al.*, 1998).

Fytoplazmy pravděpodobně vznikly z gramnegativního bakteriálního předka z rodu *Lactobacillus* podobného *Clostridium*, jejichž genom obsahuje nízkou hladinu guaninu a cytosinu (GCC) (Weisburg *et al.*, 1989). Celkové fylogenetické analýzy genu 16S rRNA a *rp* genových sekvencí operonu ukázaly, že fytoplazmy tvoří velkou diskretní monofyletickou skupinu v rámci rozšířené skupiny *Anaeroplasma* (Gundersen *et al.*, 1994). Fytoplazmická skupina je parafyletická vůči druhu *Acholeplasma*, což jsou nejbližší známí příbuzní fytoplazem (Lee *et al.*, 2007). Na základě RFLP analýz PCR-produktů úseku konzervativního genu 16Sr RNA bylo rozlišeno celkem 14 hlavních 16Sr DNA skupin (I - XIV) a 32 podskupin (a - f). Pomocí kombinace RFLP analýzy sekvencí genu pro 16S rRNA a sekvencí genu pro ribozomální protein pak bylo v rámci 14 skupin rozlišeno dalších 46 podskupin. (Lee *et al.*, 1998a).

Před rozvojem molekulárně-detekčních metod bylo velmi těžké fytoplazmy jakkoliv charakterizovat kvůli jejich neschopnosti růst v podmínkách *in vitro*. Hlavní problém vyřešily rRNA genové sekvence, díky kterým byly fytoplazmy, jiné než spiroplazmy zařazeny do třídy *Mollicutes* jako samostatná monofyletická skupina (Lim *et Sears*, 1989; Kuske *et Kirkpatrick*, 1992; Sears *et Kirkpatrick*, 1994).

Postupně bylo zjištěno, že tyto organismy jsou mnohem rozmanitější, než se původně předpokládalo. Mnohé mají celosvětový výskyt (Lee *et al.*, 1994), některé jsou omezeny na určitý kontinent či konkrétní zeměpisné oblasti. Např. fytoplazmy ze skupiny Ash yellows group (SrVII), Clover proliferation group (SrVI) a většina X-disease (SrIII) jsou pravděpodobně omezeny na americký kontinent či západní polokouli, zatímco fytoplazmy skupiny Peanut witches'-broom group (SrII) a Rice yellow dwarf group (SrXI)

na jihovýchodní region a Apple proliferation group (SrX) a Stolbur (SrXII-A) na evropský kontinent (Lee *et al.*, 1992).

3.1.1. Metody studia fytoplazem

Technický rozvoj molekulárních metod významně ovlivnil možnosti detekce fytoplazem. Fytoplazmy mohou být identifikovány mnoha postupy, a to od detekce bakteriálních buněk až po detailní rozbor fytoplazmové DNA (Fránová, 2008).

- Fluorescenční mikroskopie
- Elektronová mikroskopie (EM)
- Polymerázová řetězová reakce a real-time PCR
- Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)
- Stanovení sekvence DNA
- Sérologické metody

3.1.2. Genom fytoplazem

Velikost genomu se pohybuje od 530 kbp do 13 bp (Neimark *et Kirkpatrick* 1993; Marcone *et al.*, 1999). Zástupci rodu '*Ca. Phytoplasma*' používají kodon UGA jako stop kodon, nikoliv jako kodon tryptofanu (Lim *et Sears* 1991; Toth *et al.*, 1994). Významná je i skutečnost, že u fytoplazem byly objeveny repetitivní a mobilní elementy, které jsou z 23 % organizovány do tzv. potenciální mobilních jednotek podílejících se na variabilitě metabolických i nemetabolických drahách (Bai *et al.*, 2006). Zástupci *Mollicutes* obsahují jednu kruhovou dvouvláknovou chromozomální DNA molekulu (Neimark *et Kirkpatrick*, 1993). Obsah GCC v DNA se odhaduje na 23 - 29 % (Kollar *et Seemüller*, 1989).

Snížení velikosti genomu a divergence genomické složitosti *Mollicutes* může být důsledkem rozdílných ztrát genů během evoluce. Zdá se, že u *Mollicutes*, včetně fytoplazem, došlo ke ztrátě genů kódující syntézu makromolekul prekurzorů, jako jsou komponenty buněčné stěny, aminokyseliny, vitamíny i dlouhé řetězce mastných kyselin (Razin *et al.*, 1998).

V rámci taxonomie fytoplazem byla v roce 2004 navržena a schválena pravidla, podle kterých je možné navrhnout konkrétní druhy fytoplazem a přiřadit k nim dočasné označení druhu '*Candidatus Phytoplasma*' (viz Tab. č. 1).

'*Ca. Phytoplasma*' má charakteristickou oligonukleotidovou sekvenci jedinečné oblasti genu 16S rRNA a to CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT (IRPCM, 2004). Provizorní klasifikace je založena na příbuzenské sekvenci konzervativního ribozomálního genu 16S rRNA. Druh je kromě sekvence definován také podle okruhu hostitelů, způsobu vektorového přenosu a geografického rozšíření. V roce 2004 bylo na základě těchto pravidel rozlišeno, dle molekulární analýzy sekvence 16S rDNA, 15 skupin fytoplazem a ke každé skupině byl přiřazen provizorní, charakteristický, referenční izolát. Podle příbuznosti sekvencí izolátů byly ke skupinám přiřazeny další druhy fytoplazem. Sekvence byly seřazeny v dendrogramu do skupin, které sdílí 97 - 95 % a více shodné sekvence (IRPCM, 2004).

Specifický nukleotidový záznam, který je charakteristický pro '*Ca. Phytoplasma*', je na pozici adenin - 242, thymin - 286 a thymin - 1247 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/m30790>).

Podrobná pravidla, podle kterých je možné navrhnout konkrétní druhy fytoplazem a přiřazovat k nim jednotlivé izoláty, jsou popsány v článku IRPCM (2004).

Tab. č. 1: Přehled fylogenetických skupin fytoplazem a jejich referenčních izolátů (IRPCM, 2004, upraveno)

Fylogenetická skupina	Označení skupiny 16Sr	Druh ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> '	GenBank Ac. No.
Aster yellows group	16SrI	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '	M30790
		' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '	AB010425
Peanut witches' - broom group	16SrII	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '	U15442
X-disease group	16SrIII	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' *	L04682
Coconut lethal yellowing group	16SrIV	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> ' *	U18747
		' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> ' **	X80117
		' <i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> ' **	Y14175
		' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '	AB055986
Elm yellows group	16SrV	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '	AY072722
		' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> ' *	AF176319
		' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	AF122910
Clover proliferation group	16SrVI	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	AY390261
Ash yellows group	16SrVII	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	AF092209
Loofah witches' - broom group	16SrVIII	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> ' *	AF086621
Pigeon pea witches' -broom group	16SrIX	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	AF515636

Tab. č. 1: Pokračování

Fylogenetická skupina	Označení skupiny 16Sr	Druh ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> '	GenBank Ac. No.
Apple proliferation group	16SrX	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	AJ542541
		' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	AJ542543
		' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	AJ542544
		' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	X92869
		' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '	X76431
		' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '	AY135523
Rice yellow dwarf group	16SrXI	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	D12581
Stolbur group	16SrXII	' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	L76865
		' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' *	AF248959
BGWL group	16SrXIV	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	AJ550984
'<i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i>' group	16SrXV	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '	AF147708

* názvy druhů fytoplazem navrženy na 10. International Congress of the International Organization of Mycoplasmaology v Bordeaux v roce 1994, prozatím ale nebyly uznány jako formální

** názvy navržené na IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team at the XIV International Congress Organization of Mycoplasmaology ve Vídni roku 2002 a prozatím nejsou uznány jako formální

3.2. Skupina Elm yellows (EY)

EY poprvé detailně popsal Swingl v roce 1938 (Swingl, 1938 v Herath *et al.*, 2010), která byla objevena již v roce 1882 v údolí řeky Ohio (Baker, 1948). V ČR byl EY poprvé ohlášen v 70. letech (Bojňanský, 1969).

Hostitelskými rostlinami fytoplazmy EY v Severní Americe jsou pouze jilmy, včetně jejich přirozených hybridních druhů *Ulmus americana*, *U. rubra*, *U. alata*, *U. serotina* a *U. crassifolia* a další. Nejcitlivější druh jilmu je *U. americana*, který po infekci velice rychle odumírá. V Evropě jsou nacházeny infikované stromy druhů *U. minor*, *U. pumila* a *U. glabra* (Navrátil *et al.*, 2004). Americké druhy jilmů, kromě EY, infikují i fytoplazmy Illinois EY (16SrVI) a aster yellows (16SrI) (Jacobs *et Lee*, 2003). Nově byla v Itálii zjištěna také na příbuzném druhu zelkově pilovité (Murolo *et Romanazzi*, 2008).

Fytoplazmy EY group jsou spojovány nejen s vážným onemocněním jilmu, ale také révy vinné, ostružiníku, maliníku, třešně, olše, broskvoně a mnoha dalších rostlinných druhů v Americe, Evropě a Asii (Lee *et al.*, 2004). Zatím není známá rezistence vůči EY u jilmů, výjimkou je však komplexní hybrid jilm Homestead (Sinclair *et al.*, 2000).

V rámci této práce byla vytvořena tabulka ze sekvencí izolátů EY uvedených v současné době v GenBank (viz příloha, Tab. č. 22).

Fytoplazmy spojované s EY jsou převážně členy tzv. 16SrV-A podskupiny, podle klasifikace založené na molekulární analýze genu 16S rDNA a ribozomálních proteinových sekvencí (Lee *et al.*, 2004).

3.2.1. Elm yellows

Fytoplazma elm yellows je referenční druh Elm yellows group (16SrV). V USA způsobuje odumírání jilmů, a její výskyt byl původně zaznamenán kromě USA i v Kanadě. V Evropě byly již v minulosti na jilmech pozorovány příznaky fytoplazmatického onemocnění, které sice má mírnější průběh než v Americe, nicméně pomocí molekulárních metod byla prokázána jako původce stejná fytoplazma. Její přítomnost byla doposud zjištěna v Itálii, Francii, Německu a Srbsku. V České republice sice byly nalezeny ojedinělé stromy s příznaky fytoplazmatické infekce, přesný druh fytoplazmy však zatím nebyl jednoznačně určen, neboť dostupnými detekčními metodami nebylo jednoznačně potvrzeno, zda se jedná přímo o fytoplazmu žloutenky jilmu nebo o jiný, blízkce příbuzný druh fytoplazmy (Kapitola *et al.*, 2011).

K hlavním příznakům napadení amerických druhů jilmů patří žloutnutí, svinování a předčasný opad listů, buď na celé koruně, nebo jen na jednotlivých větvích. K příznakům na evropských druzích patří především epinastie, žloutnutí, malolistost a předčasný opad listů a metlovitost větví a kořenů. Rozdílný průběh onemocnění jilmů v Americe a Evropě se původně připisoval odlišné patogenitě místních kmenů fytoplazmy, molekulárními analýzami se však prozatím rozdíl mezi americkými a evropskými kmeny nepodařilo jednoznačně potvrdit. Rozdíl v intenzitě onemocnění je tedy spíše dán odlišnou reakcí amerických a evropských druhů jilmů na napadení fytoplazmou. Hlavním přenašečem fytoplazmy je v Americe *Scaphoideus luteolus*. V Evropě byl potvrzen přenos prstenovkou *Macropsis mendax*, k možným přenašečům patří pěnodějka obecná (*Philaenus spumarius*) a křískem *Allygidius atomarius*. Fytoplazma žloutenky jilmu byla dříve označována také jako Elm yellows phytoplasma a nyní je nově zařazena do systému pod platným názvem '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Patogen je zařazen mezi karanténní ŠO pro EU (směrnice Rady 2000/29/ES, vyhláška č. 215/2008 Sb.), a to pod svým jiným starším názvem Elm phloem necrosis mycoplasma. Na seznamu EPPO A1 je uveden jak patogen, tak jeho hlavní přenašeč *Scaphoideus luteolus* (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae). (Kapitola *et al.*, 2011).

3.2.2. Variabilita fytoplazem skupiny EY

Pro '*Ca. Phytoplasma ulmi*', hlavního zástupce skupiny 16SrV, jsou typické její unikátní sekvence. Na jejich základě se provádějí důkladnější analýzy a identifikace fytoplazem (viz Tab. č. 3). V rámci klasifikace podle Lee *et al.* (1998b) je zařazena do V. skupiny.

Tab. č. 3: Typické unikátní sekvence '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Lee *et al.*, 2004)

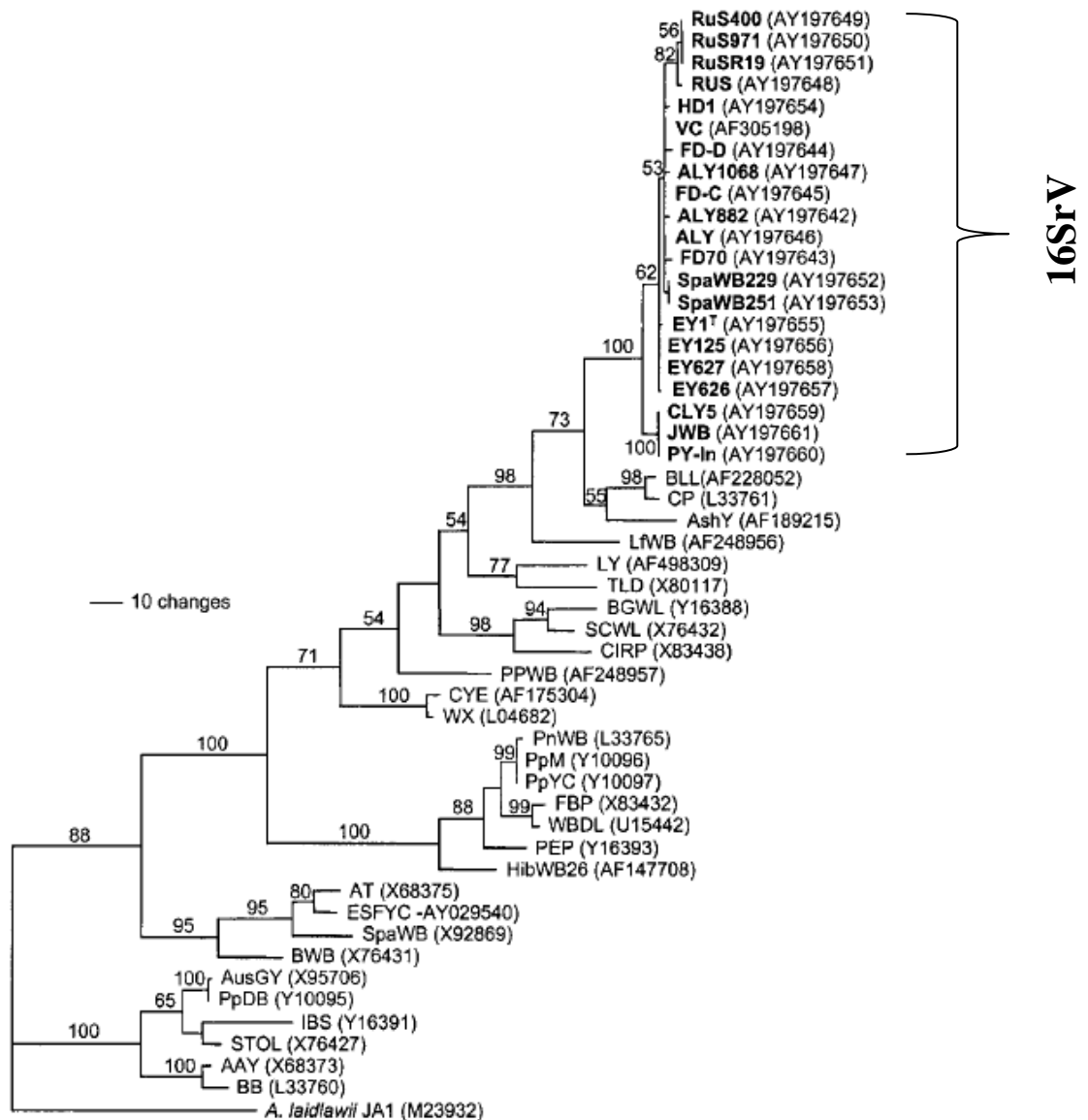
Název oblasti	Sekvence	Pozice
16S rRNA	5'-GGAAA-3'	327-835
	5'-CGTTAGTTGCC-3'	1098-1108
<i>rpl22-rps3</i>	5'-TTACGCTTGCC-3'	284-294
	5'-CATTTAAAAAATTGCTATT-3'	739-758
	5'-AAATTCTATTTCTATGGGAAT-3'	910-932
<i>SecY</i>	5'-TTTGATCCAATGTTAA-3'	350-365
	5'-GTCTTTCGGTCATGGATTGA-3'	595-614
	5'-ATTTAGTCTAAT-3'	616-627
	5'-CAAATAGAACAA-3'	1053-1064

Vzhledem k tomu, že analýza sekvencí genu 16S rRNA nebyla dostačující k postižení variability v rámci skupiny EY, byla proto genetická variabilita dále stanovena na základě dalších dvou konzervativních genů, *secY* a ribozomálního proteinového operonu (*rp*). Pro detailnější kmenovou diferenciaci byly porovnány genové sekvence 16Sr RNA a *rp* získané analýzou RFLP. Profily byly získány štěpením pomocí restričních enzymů *RsaI*, *HpaII*, *Tsp509I* a *BfaI*, které odlišily čtyři rozdílné podskupiny (16SrV-A, 16SrV-B, 16SrV-C, 16SrV-E). Další podskupina 16SrV-D byla rozpoznána na základě unikátního *TaqI* restričního místa, který je přítomný u kmene FD-D. Další profily získané restričními enzymy *MseI*, *Tsp509I*, *AluI*, *TaqI*, *HaeIII*, *HpaII*, *HhaI*, *DraI* a *SspI* rozlišily uvnitř skupiny EY 12 různých ribozomálně proteinových podskupin. Analýza restričních map *secY* vymežila 13 podskupin, z nichž 12 se shodovalo s jejich korespondující skupinou *rp*. Na základě analýzy 16S rRNA genu, byla podobnost mezi členy vysoká a pohybovala se mezi 98,6 - 99 %. Větší heterogenita byla zjištěna při analýzách *rp* a *secY* u nichž se průměrná sekvenční podobnost pohybovala mezi 94,2 - 97,4 % (*rp*) a 83,2 - 91,2 % (*secY*) (Lee *et al.*, 2004).

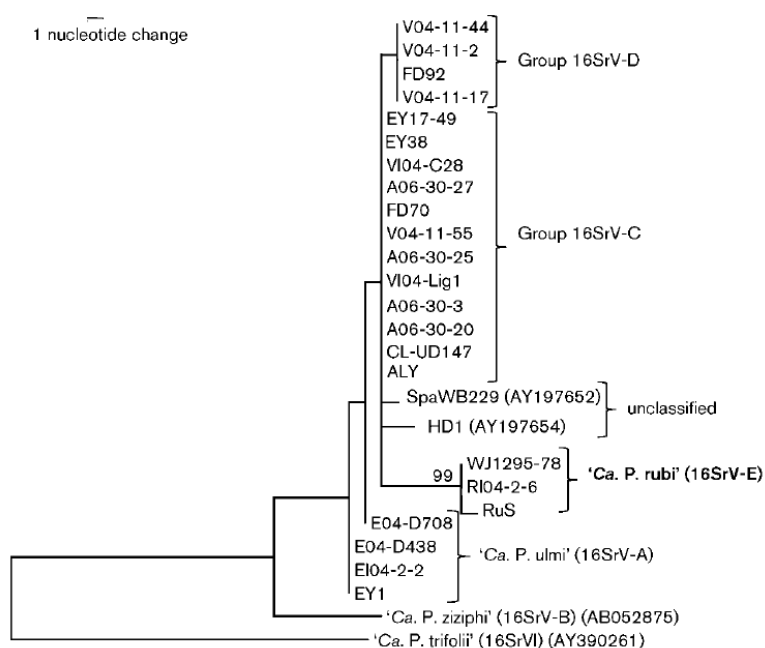
Tab. č. 2: Onemocnění, původ a rozdělení referenčních izolátů ve skupině EY (16SrV) na základě RFLP analýz 16S rRNA a genů *rp* a *secY* (podle Lee *et al.*, 2004)

Kmen	Onemocnění/hostitel	Hmyzí vektor	Původ	Klasifikace podskupin na základě RFLP		
				16SrV	<i>rpV</i>	<i>secYV</i>
ALY	Alder yellows/periwinkle	Neznámý	Itálie	C	H	H
ALY1068	Alder yellows/ <i>Alnus glutinosa</i>	Neznámý	Itálie	C	H	
ALY882	Alder yellows/ <i>Alnus glutinosa</i>	<i>Oncopsis alni</i>	Německo	C	K	K
CLY5	Cherry lethal yellows/ <i>Prunus avium</i>	Neznámý	Čína	B	B	B
EY125	Elm yellows/ <i>Ulmus minor</i>	Neznámý	Itálie	A	A	
EY1 ^T	Elm yellows/ <i>Ulmus americana</i>	<i>Scaphoideus luteolus</i>	NY, USA	A	A	A
EY626	Elm yellows/ <i>Ulmus minor</i>	Neznámý	Itálie	A	A	M
EY627	Elm yellows/ <i>Ulmus minor</i>	Neznámý	Itálie	A	A	
FD (Lomb/Piem)	Flavescence dorée/ <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Itálie	C	G	
FD-70	Flavescence dorée/ <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Francie	C	F	F
FD-C	Flavescence dorée/ <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Itálie	C	D	D
FD-D	Flavescence dorée/ <i>Vitis vinifera</i>	<i>Scaphoideus titanus</i>	Itálie	D	E	E
HD1	Hemp dogbane/ <i>Apocynum cannabinum</i>	Neznámý	NY, USA	C	J	J
JWB	Jujube witches'-broom/ <i>Ziziphus jujuba</i>	<i>Hishimonoides chinesis</i>	Čína	B	C	C
PY-In	Peach yellows/ <i>Prunus persica</i>	Neznámý	Indie	B	M	N
RUS	Rubus stunt/periwinkle	Neznámý	Itálie	E	I	I
RuS400	Rubus stunt/ <i>Rubus fruticosus</i>	Neznámý	Itálie	E	I	
RuS971	Rubus stunt/ <i>Rubus idaeus</i>	Neznámý	Švýcarsko	E	I	
RuSR19	Rubus stunt/ <i>Rubus caesius</i>	Neznámý	Německo	E	I	
SpaWB229	Spartium witches'-broom/ <i>Spartium junceum</i>	Neznámý	Itálie	C	L	L
SpaWB251	Spartium witches'-broom/ <i>Spartium junceum</i>	Neznámý	Itálie	C	L	
VC	Virginia creeper/ <i>Parthenocissus quinquefolia</i>	Neznámý	FL, USA	C		

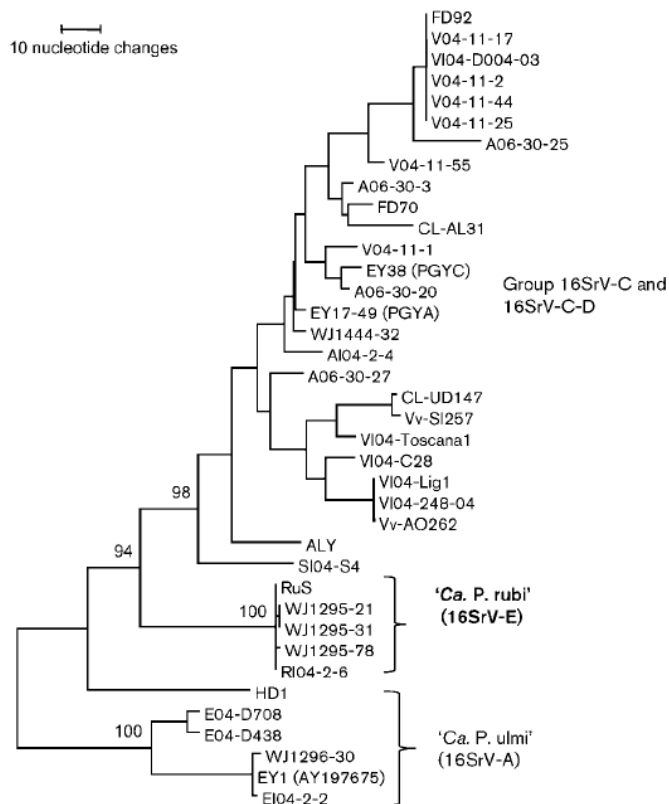
Obr. č. 1: Postavení skupiny Elm yellows v rámci fytoplazem na základě parsimonní analýzy sekvencí 16S rDNA reprezentativních izolátů skupiny EY (16SrV) a ostatních skupin 16Sr, vycházející ze společného předka *A. laidlawii* (Lee *et al.*, 2004).



Obr. č. 2 : Evoluční vztahy mezi zástupci skupiny 16SrV na základě analýzy sekvencí genů 16S rRNA. Hodnoty bootstrap menší než 90 % byly vynechány (Malembic-Maher *et al.*, 2011)



Obr. č. 3.: Evoluční vztahy izolátů ze skupiny 16SrV na základě analýzy lokusů genů *tuf*, *rpsC-rplV*, *rplF-rplR*, *degV* (Malembic-Maher *et al.*, 2011).



3.2.3. Přehled dalších druhů fytoplazem skupiny Elm yellows (16SrV)

16SrV skupina reprezentuje třetí největší skupinu fytoplazem, po skupině aster yellows a skupině X-disease, s velkou rozmanitostí izolátů, jejich rostlinných hostitelů i hmyzích vektorů (Lee *et al.*, 2004).

3.2.3.1. Jujube witches' broom

Jedinečné vlastnosti v sekvenci 16Sr JWB fytoplazem jasně ukazují, že reprezentuje nový taxon '*Ca. Phytoplasma ziziphi*'. Pravděpodobně souvisí s konkrétním hmyzím vektorem *Hishimonus sellatus*, který přenáší fytoplazmu na hostitelskou rostlinu *Zizyphus jujuba* (Jung *et al.*, 2003). *Zizyphus jujuba* je nejvíce pěstována v mírném pásmu severní polokoule jako komerčně důležitá rostlinná plodina. JWB převládá hlavně v Číně a Koreji, kde z hlediska průmyslu způsobuje vážné problémy. V Korei snižuje výnos od 30 do 80 % (Lee *et al.*, 1988) a byla detekována také na *Hovenia dulcis* (Kamala-Kannan *et al.*, 2010), rozšířená je také nejméně ve třech krajích v Japonsku (Ohashi *et al.*, 1996). Objevena byla i v New Yorku (GenBank).

3.2.3.2. Alder yellows

Alder yellows (ALY) souvisí s infekcí několika druhů olše, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *A. cordata* (Loisel.) Desf., *A. incana* (L.) Moench, *A. hirsuta* (Spach) Rupr., *A. rugosa* (Du Roi) Spreng., *A. subcordata* C. A. Mey a *A. tenuifolia* Nutt. Onemocnění bylo zaznamenáno v Německu, Itálii, Rakousku, Francii, Švýcarsku, v oblasti Baltského moře (Arnaud *et al.*, 2007), v Srbsku (Cvrkovič *et al.*, 2008) a v Litvě (Genbank). Infekce *A. glutinosa* je rozšířena zejména v Německu a v jižní Itálii. Všechny infikované druhy *Alnus* mají podobné příznaky. První indikací onemocnění jsou méně zelené listy, které později žloutnou. Southern hybridizace, RFLP a analýza sekvence odhalila, že ALY velmi úzce souvisí s EY fytoplazmou (Mäurer *et al.*, 1993; Mäurer *et Seemüller*, 1994; Seemüller *et al.*, 1994; Marccone *et al.*, 1997). Ukázalo se, že ALY je nerozeznatelné od symptomů fytoplazem infikující *Rubus* a eukalyptus, proto se pro analýzu používá několik endonukleáz včetně *TaqI* (Marccone *et al.*, 1997).

3.2.3.3. Flavescence dorée

Jedná se o další významnou karanténní fytoplazmu ze skupiny 16SrV, která je spojena s nejdůležitější „žloutenkovou“ nemocí vinné révy. Jediným známým FD přenašečem je křísek révový - *Scaphoideus titanus* (Homoptera: Cicadellidae) (Mori *et al.*, 2002). Do Evropy se dostal ze Severní Ameriky. Mimo Evropu a Severní Ameriku byl nedávno potvrzen v Austrálii (Červená *et* Nečekalová, 2007).

Vzhledem k tomu, že tato fytoplazma nemůže být rozlišena na základě symptomů, vykazuje totiž stejné symptomy jako Bois noir (Stolbur 16SrXII), byl vyvinut jednoduchý, spolehlivý a citlivý test detekující fytoplazmu FD při nízkém titru. Test bi-specifické multiplex 'nested' PCR se používá ve Francii ke každoročnímu plošnému průzkumu (Clair *et al.*, 2003).

Z hlediska České republiky jsou významné obě nejdůležitější fytoplazmy révy (Stolbur i FD). Přestože u nás nebyla fytoplazma FD zatím zjištěna. Infekce obou fytoplazem se na révě projevuje v podstatě stejnými příznaky. Výskyt fytoplazmy stolburu bramboru byl na našem území v nedávné době prokázán a v posledních letech je na našem území potvrzováno její šíření. (Červená *et* Nečekalová, 2007; Navrátil *et al.*, 2008; Flídr, 2010; Šafářová *et al.*, 2011).

Příznaky se mohou projevit na celém keři nebo pouze na některých výhonech. Nápadné je hlavně předčasné intenzivní zbarvení a skvrnitost listů, u bílých odrůd žlutě a u modrých odrůd červeně. Letorosty jsou slabší, kratší, internodia letorostů mohou být zkrácená. U květů a plodů dochází k usychání a opadu květenství, při slabším projevu odumírají stopky a části třapiny a bobule se scvrkávají, méně postižené bobule mají nižší cukernatost a vyšší obsah kyselin (Červená *et* Nečekalová, 2007).

Přenašečem fytoplazmy zlatého žloutnutí révy na olši je prstenovka olšová (*Oncopsis alni*) a pravděpodobným přenašečem na plaménku čelnatka řebříčková (*Dictyophara europaea*) (Červená *et* Nečekalová, 2007).

3.2.3.4. Rubus stunt (witches'-broom phytoplasma disease)

Rubus stunt (RS) fytoplazma se vyskytuje v Evropě, v Rusku a na středním východě. Přirozeně infikuje pouze rostliny rodu *Rubus*, divoké i kultivované druhy. Hlavním vektorem je *Macropsis fuscula* Zett. (de Fluiter *et* van der Meer, 1953). Na základě analýz sekvence genu 16S rRNA byla dostatečně diferencovaná a nyní představuje nový taxon 'Ca. Phytoplasma rubi' (Malembic-Maher *et al.*, 2011). Mezi rostlinné hostitele patří druhy rodu

Rubus, *R. caesius* (ostružiník sivý), *R. fruticosus* (ostružiník křovitý), *R. idaeus* (maliník obecný), *R. laciniatus* (ostružiník dřípený), *R. loganobaccus* a *R. procerus* či brčál (*Vinca major*). Všechny infikované druhy *Rubus* vykazují podobné příznaky, jako např. deformace či zakrslost plodů, phylloidy, změna barvy květenství, deformace a žloutnutí listů, kořeny vykazující typické hairy root a witches broom. (<http://www.plantwise.org/?dsid=48018&loadmodule=plantwisedatasheet&page=4270&site=234>).

K dalším, z hospodářského hlediska méně významným fytoplazmám skupiny EY, patří fyto plazma hemp dogbane yellows, která byla objevena na toještě konopné (*Apocynum cannabinum*) a to v New Yorku; na této rostlině byla však detekována také fyto plazma flavescence dorée. Grapevine yellows fyto plazma byla na evropské vinné révě (Daire *et al.*, 1997; Martini *et al.*, 2002; Seemüller *et al.*, 1994). Fyto plazma cherry lethal yellows byla na třešni ptačí (*Prunus avium*) a to v Číně. V Indii se vyskytují fyto plazmy nectarine yellows a peach yellows, která však byla objevena i v Itálii a to na broskvoni obecné (*Prunus persica*) a na brčálu. Eucalyptus little leaf fyto plazma u druhů *Eucalyptus* sp. v Itálii (Marcone *et al.*, 1996). Fyto plazma periwinkle yellows byla detekována na barvínku růžovém (*Catharanthus roseus*) v Číně. Fyto plazma Wax laef privet witches'-broom se vyskytuje v Korei na ptačím zobu (*Ligustrum japonicum*). Fyto plazma spartium witches'-broom byla v Itálii na vítečníku sítinovém (*Spartium junceums*). Fyto plazma virginia creeper byla poprvé objevena v USA na loubinci pětিলístém (*Parthenocissus quinquefolia*) (GenBank; Lee *et al.*, 2004). Mezi nově objevený druh patří 'Ca. Phytoplasma rubi' (Malembic-Maher *et al.*, 2011).

3.3. Výskyt fytoplazem v ČR

Na území České republiky probíhá výzkum zabývající se detekcí fytoplazem v různých hostitelských rostlinách včetně plevelů.

V ČR byl detekován výskyt fytoplazem ze skupiny Aster yellows (16SrI) napadající velký okruh hostitelů (např.: česnek, jahodník, jabloň, jitrocel, lípa, jetel, pcháč, lilie), fyto plazmy skupiny X-disease (16SrIII) na jetelu či astře, dále byly potvrzeny fyto plazmy ze skupiny Apple proliferation group (16SrX), a to fyto plazma proliferace jabloně ('Ca. Phytoplasma mali', Apple proliferation phytoplasma, AP (16SrX-A) (jabloň, rybíz). Široce rozšířená je fyto plazma stolburu ('Ca. Phytoplasma solani', 16SrXII-A) infikující např. révu vinnou, brambor, papriku, rajče, celer, lilek i pcháč, svlačec a kopřivu (Navrátil *et al.*, 2008).

Fytoplazmy skupiny 16SrIII a 16SrXII byly detekovány i v jiných plevelech z oblasti jižní Moravy, a to na merlíku bílém s příznaky žloutnutí a zakrnělosti (Šafářová *et al.*, 2011).

U plevelů z jiných oblastí ČR byla zjištěna celá řada fytoplazem - jeteli lučním (*Trifolium pratense*) a j. zvrhlém (*T. hybridum*) byly detekovány fytoplazmy skupin 16SrI-C a 16SrIII-B a na jeteli plazivém (*T. repens*) fytoplazmy náležející do skupiny 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII-B a 16SrX-A. Jetele vykazovaly příznaky červenání nebo trpasličího růstu (Fránová *et al.*, 2004).

Další výskyt fytoplazem v ČR byl detekován na rybízu bílém a červeném, a to 16SrI a 16SrX (Navrátil *et al.*, 2007). Na ovocných stromech se běžně vyskytuje fytoplazma 'Ca. Phytoplasma prunorum' skupiny 16SrX na meruňce, broskvoni a višni (Ludvíková *et al.*, 2011). Sezónní detekce fytoplazem prokázala výskyt fytoplazmy skupiny 16SrX 'Ca. Phytoplasma pyri' (16SrX-C) na hrušních (Kučerová *et al.*, 2007).

Při kontrolách jilmů na jižní Moravě v letech 1997-2007 se vykytovalo pár stromů jilmu habrolistého s příznaky metlovitosti a zakrslými listy, v jednom z nich byla detekována fytoplazma 'Ca. Phytoplasma ulmi' (Navrátil *et al.*, 2009). Sporadický výskyt této fytoplazmy na území ČR autoři vysvětlují tím, že zde chybí hlavní vektor *Macropsis mendax*. Ostatní druhy vektoru fytoplazmy EY *Philaenus spumarius* L. a *Allygidius atomarius* (Pavan, 2000) byly zaznamenány pouze v několika nejteplejších oblastech ČR (Navrátil *et al.*, 2009).

Výskyt fytoplazmy Elm yellows na jiných hostitelích než na jilmu byl na Moravě ojedinělý a to na pcháči a svlačci (Flídr, 2010).

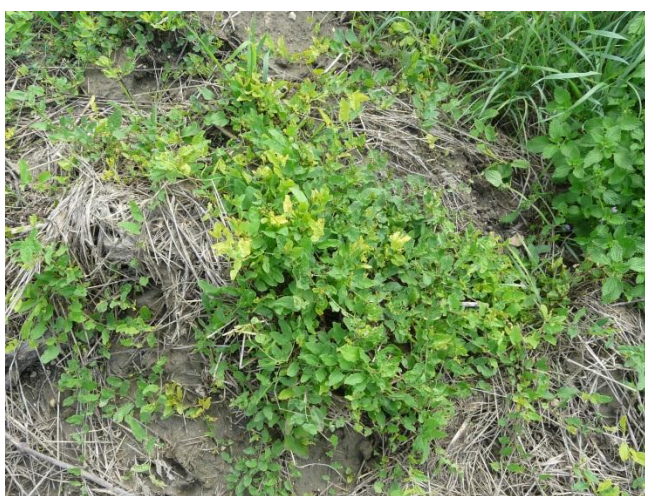
Fytoplazma EY (syn. Elm phloem necrosis mycoplasma) může mít velký hospodářský význam a je proto zařazena mezi karanténní fytoplazmy, které se vyskytují ve Společenství EU, společně s 'Ca. Phytoplasma mali', 'Ca. Phytoplasma prunorum' a 'Ca. Phytoplasma pyri', jejichž zavlékání a rozšiřování na území Společenství je zakázáno (Růžička, 2008).

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

V rámci experimentální části bakalářské práce jsem provedla analýzu DNA izolovanou z rostlin pcháče osetu (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) - vzorek č. CZ3777 a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis* (L.)) - vzorek č. CZ3782 (viz Tab. č. 4), které rostly na poli v katastru obce Lednice na jižní Moravě. Rostliny vykazovaly příznaky chlorózy, zakrnělosti a proliferace, typické pro fytoplazmové onemocnění (viz Obr. č. 4, 5, foto Válová).

Obr. č. 4: Svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* (L.)) s příznaky chlorózy a proliferace



Obr. č. 5: Pcháč oset (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) s příznaky chlorózy a zakrnělosti



Tab. č. 4: Seznam analyzovaných vzorků odebraných na lokalitě Lednice

Číslo izolátu	Hostitel	Příznaky	Lokalita sběru	Datum odběru
CZ3777	svlačec rolní	chloróza, proliferace	Lednice	23. 4. 2007
CZ3782	pcháč oset	chloróza, zakrnělost	Lednice	23. 4. 2007

4.2. Izolace DNA

Celková DNA byla izolována modifikovanou CTAB metodou podle Ahrens *et Seemüllera* (1992) z rostlin zmrazených na -80 °C. Vyizolovaná DNA byla lyofilizována a uchovávána v -80 °C. Izolace DNA byla provedena pracovníky Laboratoře molekulární biologie organismů, Katedry buněčné biologie a genetiky.

4.3. Příprava DNA vzorků pro PCR analýzu

Lyofilizovaná DNA obou vzorků byla rozpuštěna v 100 µl deionizované vody a následně byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace pomocí Nanodrop1000. DNA byla poté pro PCR reakci zředěna na optimální hodnotu cca 50 ng/µl. Údaje o koncentracích vzorků jsou uvedeny níže v Tabulce č. 5.

Tab. č. 5: Koncentrace DNA a jejich čistota a jejich následné ředění

Číslo vzorku	c DNA [ng/µl]	Poměr A_{260}/A_{280}	Ředění izolované DNA
CZ3777	449,4	2,02	9x
CZ3782	131,1	2,10	2,5x

4.4. Polymerázová řetězová reakce

Detekce fytoplazem byla u vzorků provedena standardní metodou tzv. dvoukrokové 'nested' PCR.

V prvním kroku PCR amplifikace byl fragment 16S-23SrDNA detekován pomocí páru univerzálních primerů P1/P7 (sekvence viz Tab. č. 6). Byl očekáván produkt o délce cca 1 800 bp. Reakční směs (složení viz Tab. č. 7) byla připravena ve flowboxu za sterilních podmínek a za neustálého chlazení použitých roztoků na ledu. Po promíchání reakční směsi ve vortexu a centrifugaci byla směs rozpipetována po 23 µl do 0,2 ml PCR zkumavek,

do prvních dvou byly přidány jednotlivě 2 μl DNA vzorku (CZ3777, CZ3782) naředěné na optimální koncentraci. Do třetí zkušavky, která sloužila jako tzv. slepá kontrola, byly místo templátové DNA napipetovány 2 μl deionizované vody. Směsi v jednotlivých zkušavkách byly opět promíchány, po důkladném uzavření víček byly zkušavky vloženy do termocycleru a provedena PCR amplifikace. Podmínky PCR reakce jsou popsány v Tabulce č. 8.

Tab. č. 6: Seznam použitých primerů

Název primeru	Sekvence primeru	Autoři
P1	5'-AAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATT-3'	Deng <i>et Hiruki</i> , 1991
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	Schneider <i>et al.</i> , 1995
R16F2	5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3'	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
R16R2	5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG 3'	Lee <i>et al.</i> , 1993

Tab. č. 7: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci při použití primerů P1/P7

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μl]	3 testy [μl]
Pufr	5x	1x	5	15
MgCl ₂	25 mmol.l ⁻¹	1,5 m mol.l ⁻¹	1,5	4,5
Voda			15	45
dNTP	2 m mol.l ⁻¹	100 μ mol.l ⁻¹	1	3
f primer	20 pmol/ μl	0,25 μ mol.l ⁻¹	0,3	0,9
r primer	20 pmol/ μl	0,25 μ mol.l ⁻¹	0,3	0,9
GoTaq polymeráza	5 U/ μl	1 U/ μl	0,2	0,6
Celkový objem			69	
Objem do reakce			25	

Tab. č. 8: Podmínky PCR amplifikace při použití primerů P1/P7

95°C	3 min	
95°C	1 min	} 35 cyklů
55°C	1 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	

Pro druhý krok PCR amplifikace, 'nested' PCR, byly jako templátová DNA použity produkty z 'direct' PCR. Produkty P1/P7 byly kvůli možné inhibici reakce ředěny 40x. Amplifikace byla provedena za použití univerzálního páru primerů R16F2/R16R2 (viz Tab. č.

6). Očekávaným produktem byl fragment o velikosti cca 1 200 bp. Byla připravena reakční směs pro 4 vzorky. Složení reakční směsi bylo, s výjimkou použitých primerů, shodné s předchozí reakční směsí (viz Tab. č. 7). K reakční směsi byly stejně jako v předchozím kroku přidány 2 µl PCR-produktu z 'direct' PCR, do čtvrté zkumavky byla místo templátové DNA pipetována deionizovaná voda. Byla provedena PCR amplifikace, podmínky reakce jsou shrnuty v Tabulce č. 9.

Tab. č. 9: Podmínky PCR amplifikace při použití primerů R16F2/R16R2

95°C	2 min	
95°C	1 min	} 35 cyklů
50°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

4.4.1. Gelová elektroforéza

PCR-produkty 'direct' a 'nested' PCR byly rozděleny gelovou elektroforetickou separací. 1,5% agarózový gel byl připraven smícháním 0,75 g agarózy a 50 ml TAE pufru (složení viz příloha) a poté rozvařen v mikrovlnné troubě. Po mírném zchládnutí bylo přidáno 3,5 µl barviva GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, které bylo řádně rozmícháno. Gel byl následně nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu (cca 30 min) byl gel v elektroforetické komůrce převrstven TAE pufrem do výše cca 0,5 cm nad gel a poté byl elektroforetický hřebínek opatrně vytažen. Do první jamky byla napipetovány 2 µl standardu molekulové váhy (Gene RulerTM, 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas). Do dalších jamek bylo napipetováno po 3 µl PCR-produktu spolu s 2 µl vzorkovacího pufru (0,1% bromfenolová modř v 30% glycerínu). Elektroforetická separace probíhala při 80 V po dobu 1 h. Po ukončení separace PCR-produktů byl gel vyjmut, opatrně opláchnut destilovanou vodou a umístěn na UV-transluminátor. PCR-produkty byly následně vizualizovány v procházejícím UV a dokumentovány pomocí dokumentačního zařízení Syngene (program GeneSnap).

4.5. Izolace PCR-produktů

PCR-produkty byly pro další manipulace izolovány pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit podle pokynů výrobce. Před vlastní izolací byly PCR-produkty separovány v 1% agarózovém gelu v prostředí TAE pufr a ethidium bromidu (zásobní roztok - 10 mg/ml,

2 μ l na 50 μ l gelu). Pro izolaci byl do jamek gelu nanesen veškerý PCR-produkt a byla provedena separace při stejnosměrném napětí napětí 80 V.

Agarózový gel byl umístěn na UV-transluminátor a za pomoci sterilního skalpelu byly, za procházejícího UV světla, vyříznuty jednotlivé specifické PCR-produkty a vloženy do předvážených mikrozkušavek Eppendorf (1,5 ml). Po opětovném zvážení zkumavek byla odečtena hmotnost vyříznutého gelu. Do zkumavek byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1. Pro rozpuštění gelu byla směs 5 min inkubována při teplotě 50 °C v Dry-bloku a rozmíchána na vortexu. Následovně byl přidán 1 objem izopropanolu, celý objem směsi byl přenesen na kolonu (cca 700 μ l) a centrifugován 1 min při 13 000 ot. Supernatant byl odstraněn a na kolonu bylo napipetováno 500 μ l QG pufru, kolona byla centrifugována 1 min při 13 000 ot. Supernatant byl odstraněn a na kolonu bylo napipetováno 750 μ l PE pufru. Kolona byla opět centrifugována 1 min při 13 000 ot. Po odstranění supernatantu byla provedena další centrifugace. Kolona byla poté přemístěna do nové zkumavky (1,5 ml) a k uvolnění navázané DNA bylo na ni napipetováno 30 μ l destilované vody, zkumavka se nechala 1 min stát a poté byla centrifugována 1 min při 13 000 ot. Izolovaná DNA byla lyofilizována ve SpeedVac a následně rozpuštěna v 10 μ l deionizované vody. Takhle připravený vzorek byl použit pro klonování PCR fragmentu.

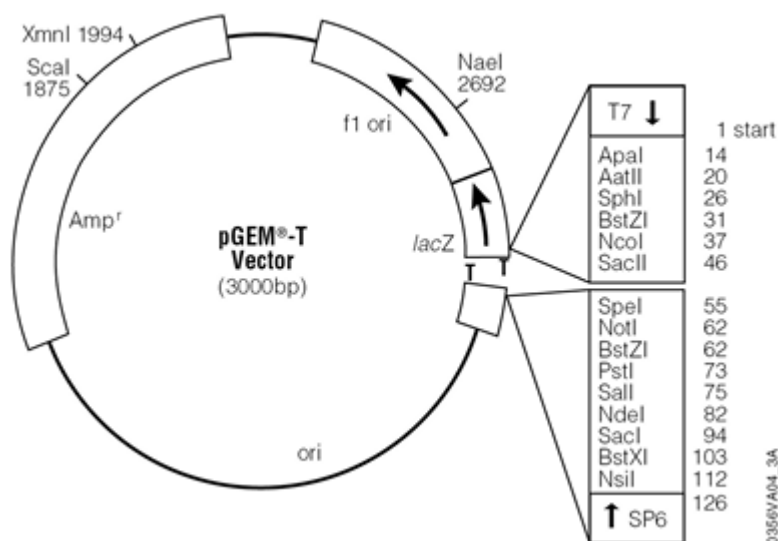
4.6. Klonování PCR-produktu

4.6.1. Ligace DNA do plazmidu

PCR-produkty izolované z gelu byly dále ligovány do pGem-T plazmidu (viz Obr. č. 6) pomocí kitu pGEM-T vector System (Promega, USA). Byla připravena ligační směs (složení viz Tab. č. 10). Ligační směs byla jemně promíchána na vortexu, centrifugována a ponechána přes noc při 4 °C.

Obr. č. 6: Mapa pGEM-T plazmidu

http://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/



Tab. č. 10: Složení ligační směsi kitu pGEM-T Vector system

Položka	Objem [μl]
pGem-T ligační pufr	5
pGem-T plazmid	1
T4 DNA ligáza	1
vyizolovaný PCR-produkt	3

4.6.2. Transformace bakterií *E. coli*

Pro klonování daného fragmentu DNA byly použity kompetitivní bakterie *E. coli* kmen JM109. 75 μl suspenze kompetitivních buněk bylo smícháno s 5 μl ligační směsí. Vzniklá směs byla následně inkubována 20 min na ledu. Transformace bakterií byla provedena teplotním šokem při 42 °C po dobu 45s (DryBlock), suspenze byla poté přenesena na 2 min na led. Ke zchlazeným buňkám bylo napipetováno 850 μl SOC média. Buňky byly následně opět inkubovány na třepačce při 37 °C po dobu 90 min. Po inkubaci byly buňky centrifugovány 3 min při 5 000 ot., supernatant byl následně odpipetován (cca 850 μl). Sediment byl rozpuštěn v 50 μl kultivačního média. Následně byla na selekční LB medium v Petriho miskách (složení viz příloha), do kterého byl přidán ampicilin (koncentrace 100 μg/1 ml) a potřen 40 μl X-Galem (složení viz příloha) a 4 μl IPTG (složení viz příloha), napipetována připravená směs. Bakterie byly inkubovány přes noc při 37 °C, za tmy

v inkubátoru. Následující den bylo možno vyhodnotit narostlé bakteriální kolonie. Kolonie nesoucí vložený inzert byly bílé, negativní kolonie byly modré.

4.6.3. Test bakteriálních kolonií pomocí 'colony' PCR reakce

Pomocí 'colony' PCR reakce byla ověřena úspěšnost ligace a transformace bakterií. Cílový fragment byl amplifikován pomocí páru primerů M13f a M13r (sekvence viz Tab. č. 12). Složení reakční směsi bylo, s výjimkou použitých primerů, shodné s předchozími reakčními směsami, rozdílné byly jen pipetované objemy (viz Tab. č. 11). Úprava reakční směsi byla také stejná. Vzorčky (bakterie jednotlivých analyzovaných bílých kolonií) byly přeneseny sterilními bambusovými párátky do zkumavek. Podmínky PCR amplifikace viz Tabulka č. 13. Produkty 'colony' PCR byly vyhodnoceny elektroforetickou separací na 1% agarózovém gelu (viz 4.4.1).

Tab. č. 11: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci při použití primerů M13f/M13r

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	1 test [μl]	15 testů [μl]
Pufř	5x	1x	5	75
MgCl ₂	25 m mol.l ⁻¹	1,5 m mol.l ⁻¹	1,5	22,5
Voda			15,3	229,5
dNTP	2 m mol.l ⁻¹	100 μ mol.l ⁻¹	2,5	37,5
M13f primer	20 pmol/μl	0,2 μ mol.l ⁻¹	0,25	3,75
M13r primer	20 pmol/μl	0,2 μ mol.l ⁻¹	0,25	3,75
GoTaq polymeráza	5 U/μl	1 U/ μl	0,2	3
Celkový objem			375	
Objem do reakce			25	

Tab. č. 12: Sekvence páru primerů M13f/M13r (Messing, 1983)

M13f: 5'-GTAAAACGACGGCCA G-3'

M13r: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tab. č. 13: Podmínky PCR amplifikace při použití primerů M13f/M13r

94°C	5 min	
94°C	1 min	} 35 cyklů
55°C	2 min	
72°C	3 min	
72°C	10 min	

4.6.4. Příprava bakteriálních konzerv

Pro možnost dodatečných analýz byly bakterie uchovávány v tzv. bakteriálních konzervách. Bakterie jednotlivých analyzovaných pozitivních kolonií byly přeneseny sterilními párátky do tekutého LB média s přidavkem ampicilinu (100 µg/1 ml media), a následně byly v mikrozkušavkách eppendorf, za stálého překlápění na třepačce inkubovány při 37°C přes noc. Další den bylo do zkumavek s transformovanými bakteriemi přidáno 0,15 ml sterilního 15% roztoku glycerolu a byly přiměřeně promíchány na vortexu. Následně byly tyto bakteriální konzervy uschovány v mrazicím boxu při -20 °C.

4.6.5. Izolace produktů M13f/M13r

Produkty PCR reakce za použití primerů M13f/M13r byly izolovány pomocí QIAquick extraction kit, OIAGEN, Germany, a to postupem který je popsán výše (viz 4.5). Koncentrace izolované DNA by stanovena fluorometricky, pomocí fluorometru. Izolované DNA fragmenty byly následně sekvencovány.

4.7. Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů produktů PCR

PCR-produkty 'nested' PCR (R16F2/R16R2) byly identifikovány RFLP analýzou. DNA fytoplazem byla štěpena restrikčními enzymy *MseI* a *RsaI*. Složení reakční směsi viz Tabulka č. 14. Ke směsi bylo napipetováno 9 µl 'nested' PCR-produktu. Směs byla poté zakápnuta minerálním olejem a inkubována při 37°C po dobu 16 h (přes noc) v termobloku.

Tab. č. 14: Složení reakční směsi pro RFLP analýzu

Položka	1 test [µl]	2 testy [µl]
Pufr	1,25	2,5
BSA 10x	1,25	2,5
Voda	0,8	1,6
Restrikční endonukleáza	0,2	0,4
Celkový objem	7	
Objem do reakce	3,5	

Produkty RFLP analýzy (po inkubaci) byly separovány ve 2,5% agarózovém TBE gelu (MetaPhor® Agarose) s 3 µl barviva GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain). Do první jamky bylo nanášeno 2 µl standardu molekulové hmotnosti (Gene Ruler™ 100bp

DNA Ladder), do druhé a třetí jamky bylo po 5 µl napipetová naštípáný PCR-produkt R16F2/R16R2 obou vzorků (CZ3777, CZ3782) spolu s enzymem *MseI*, do další jamky byl opět napipetován standardu molekulové hmotnosti. Do páté a šesté jamky byl opět napipetován PCR-produkt R16F2/R16R2 obou vzorků s enzymem *RsaI*. Elektroforetická separace probíhala při 50 V po dobu cca 60 min a po skončení byly výsledky zdokumentovány UV-transluminátorem pomocí programu GeneSnap a dokumentačního systému G:Box Syngene.

4.8. Sekvencování

Z každého analyzovaného izolátu byly pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, UK) sekvencovány tři kolonie.

4.8.1. Příprava sekvenační směsi

Byla připravena reakční směsi pro šest vzorků bakteriálních kolonií, složení viz Tabulka č. 15. Vzhledem k velikosti sekvencovaného fragmentu cca 1 250 bp bylo do reakce použito 40 ng templátové DNA v celkovém objemu 4 µl. Celkem byly připraveny 3 reakční směsi obsahujících vždy odlišný primer, a to primery fU5, M13f a M13r (viz Tab. č. 16). Reakční směs byla rozpipetována po 7 µl do 0,2 ml PCR zkumavek, do kterých byly přidány 3 µl vzorku. Vlastní sekvencování bylo provedeno pracovníky laboratoře na Ústavu experimentální botaniky ČR v Olomouci pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM model 3730.

Tab. č. 15: Složení reakční směsi pro sekvencování

Položka	1 test [µl]	6 testů [µl]
BigDye	1	6
Pufr	1	6
Voda	3	18
primer	2	12
Celkový objem	42	
Objem do reakce	7	

Tab. č. 16: Sekvence použitých primerů pro sekvencování

M13f:	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	(Messing, 1983)
M13r:	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	(Messing, 1983)
fU3	5'-CGGCAATGGAGGAAACT -3'	(Lorenz <i>et al.</i> , 1995)

4.9. Identifikace a fylogenetická analýza izolátů

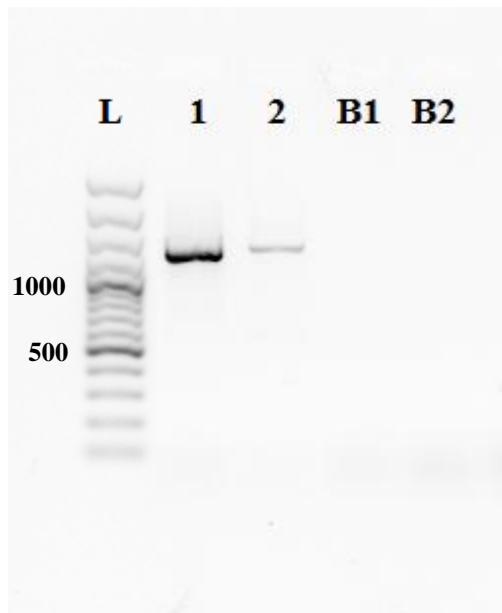
Získané sekvence byly sestaveny do konečných kontigů pomocí programu Seqman. Složené sekvence vzorků byly srovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>), dále byly sekvence analyzovány i pomocí specializovaného software iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>; Zhao *et al.*, 2009). Dle parametrů identity sekvencí byla zjištěna homologie se sekvencemi známých organismů.

Na základě uvedených analýz, včetně gelové RFLP analýzy, byly fytoplazmy analyzovaných izolátů identifikovány. Získané sekvence byly seřazeny (viz výsledky Obr. č. 13, 14) se sekvencemi vybraných izolátů fytoplazem skupin 16SrV získaných z databáze GenBank. Pomocí programu ClustalW byl sestaven mnohočetný alignment. Pomocí programu MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) a metody neighbor-joining analýzy byla provedena fylogenetická analýza a byl vytvořen fylogenetický strom.

5. Výsledky

Pomocí 'nested' PCR reakcí s primery P1/P7 a R16F2/R16R2 byl získán produkt o velikost cca 1 200 bp, což odpovídalo očekávání a značil potenciální přítomnost fytoplazmy. Žádná pozitivní reakce nebyla zaznamenána u vzorku PCR s vodou (Obr. č. 7).

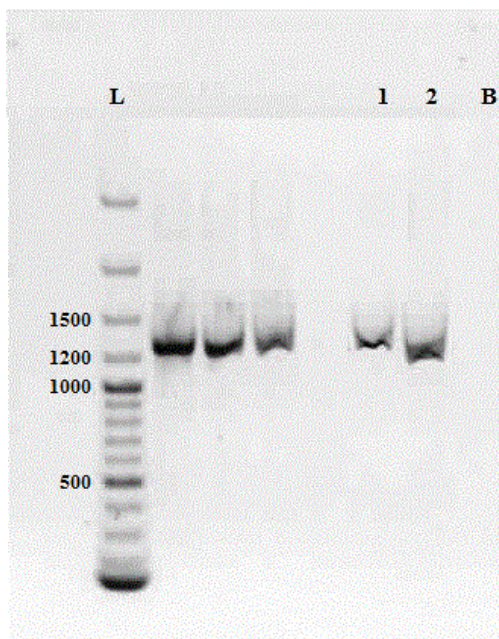
Obr. č. 7: PCR-produkt amplifikovaný s primery R16F2/R16R2



Legenda: dráha L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas); dráha 1: CZ3782 z pcháče; dráha 2: CZ3777 ze svlačce; B1: blank - negativní kontrola 1; B2: blank - negativní kontrola 2

Po izolaci PCR-produktu R16F2/R16R2 byl získán produkt o velikosti cca 1 200 bp (Obr. č. 8).

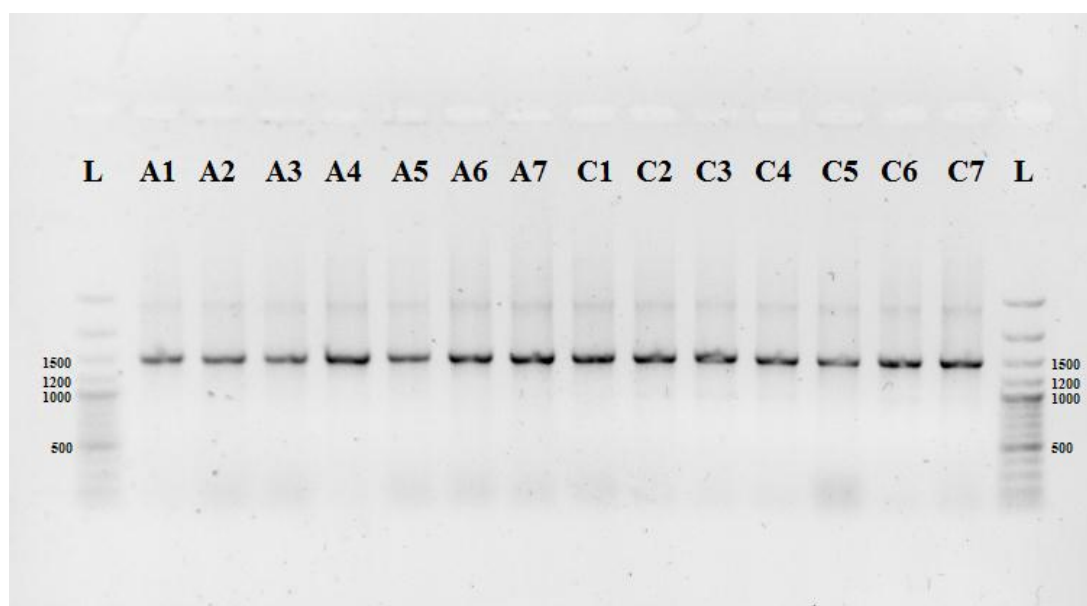
Obr. č. 8: PCR-produkt R16F2/R16R2 po izolaci z gelu



Legenda: dráha L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas); dráha 1: CZ3782 z pcháče; dráha 2: CZ3777 ze svlačce; B: blank - negativní kontrola

Po ligaci fragmentů (PCR-produktů s primery R16F2/R16R2) do plazmidu a po transformaci bakterií plazmidem, bylo z každého vzorku vybráno 7 bílých kolonií, které byly testovány pomocí PCR reakce za použití M13f/M13r primerů. Velikost produktu (cca 1500 bp) byla zjištěna elektroforeticky (Obr. č. 9). U všech analyzovaných kolonií byla potvrzena přítomnost inzertu.

Obr. č. 9: Testování přítomnosti inzertu v bílých koloniích - detekce PCR-produktů amplifikovaných s primery M13f/M13r



Legenda: dráha L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas); dráha A1 - A7: PCR-produkt z bílé kolonie s inzertem ze vzorku CZ3782 z pcháče; dráha C1 - C7: PCR-produkt z bílé kolonie s inzertem ze vzorku CZ3777 ze svlačce

Vzorky byly přečištěny a po označení sekvencovány.

Po složení sekvencí (program SeqMan) obou izolátů byly získány sekvence o délkách 1 227 bp (CZ3777) a 1 238 bp (CZ3782). Obě sekvence vykazovaly výraznou sekvenční odlišnost a výsledky BLAST analýzy ukázaly, že se jedná o dvě různé fytoplazmy, patřící do různých taxonomických skupin. Výsledky BLAST analýzy jsou uvedeny v Tabulce č. 17 a č. 18.

Vzorek CZ3777 ze svlačce vykazoval největší identitu 99 %, a to se sekvencemi izolátů '*Ca. Phytoplasma mali*', která je řazena do skupiny 16SrX-A (Apple proliferation group, Acc. no. JN555598.1) a jejímiž hostiteli byla jabloň domácí.

Vzorek CZ3782 z pcháče měl nejvyšší identitu 99 % s fytoplazmou skupiny 16SrXII (Stolbur group, Acc. no. JN887313.1), a to nejvíce s izolátem '*Ca. Phytoplasma solani*', jejímž hostitelem byl hrách setý. Hostitelé dalších izolátů řadících se do skupiny fytoplazem stolburu, které vykazovaly stejnou identitu, jsou svlačec rolní a réva vinná.

Tab. č. 17: Výsledky BLAST analýzy R16F2/R16R2 sekvence 16S rDNA vzorku CZ3777 (svlačec rolní)

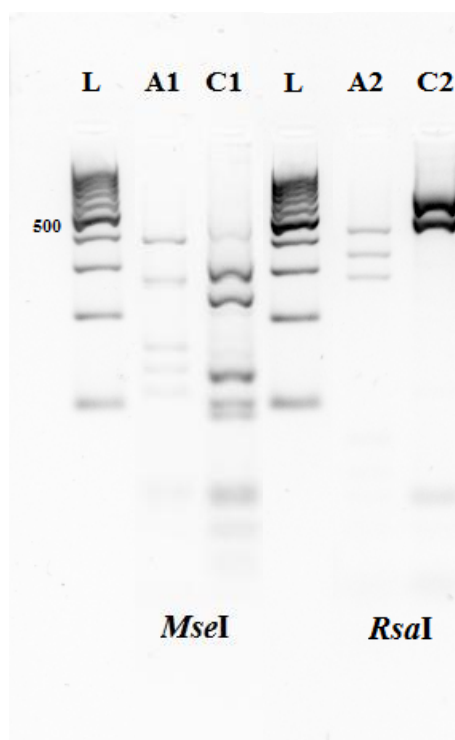
Accession number	Druh fytoplazmy	Query coverage	Max ident
JN555598.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
JN555597.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
JN555596.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
JN555595.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
JN555594.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
CU469464.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
EF392656.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
EF392655.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
AY598319.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%
AJ542542.1	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	100%	99%

Tab. č. 18: Výsledky BLAST analýzy R16F2/R16R2 sekvence 16S rDNA vzorku CZ3782 (pcháč oset)

Accession number	Druh fytoplazmy	Query coverage	Max ident
JN887313.1	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	99%	99%
JN561702.1	' <i>Convolvulus arvensis</i> ' stolbur phytoplasma clone	99%	99%
GU004375.1	Stolbur-Rus phytoplasma strain	99%	99%
GU004374.1	Stolbur-It phytoplasma strain PTV	99%	99%
FJ409899.1	Phytoplasma sp. BN-Ma202; 16SrXII (Stolbur group)	99%	99%
GU060495.1	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	99%	99%
EU836656.1	Phytoplasma sp. BN-Op37; 16SrXII (Stolbur group)	99%	99%
EU836649.1	Phytoplasma sp. BN-Fc13; 16SrXII (Stolbur group)	99%	99%
EU661607.1	Iranian potato purple top phytoplasma; 16SrXII (Stolbur group)	99%	99%
EU814645.1	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	99%	99%

Výsledné profily analyzovaných izolátů získané štěpením R16F2/R2 PCR-produktu enzymy *MseI* a *RsaI* pomocí gelové RFLP analýzy byly srovnány s profily fytoplazem podle Lee *et al.* (1998). Profily izolátu CZ3782 z pcháče (viz jamky A1 a A2 na Obr. č. 10) vykazovaly identitu se stolburem (izolát CellY; 16SrXII-A). Profily izolátu CZ3777 ze svlačce (viz jamky C1 a C2 na Obr. č. 10) odpovídaly fytoplazmě proliferace jabloně (izolátu AP-A; 16SrX-A).

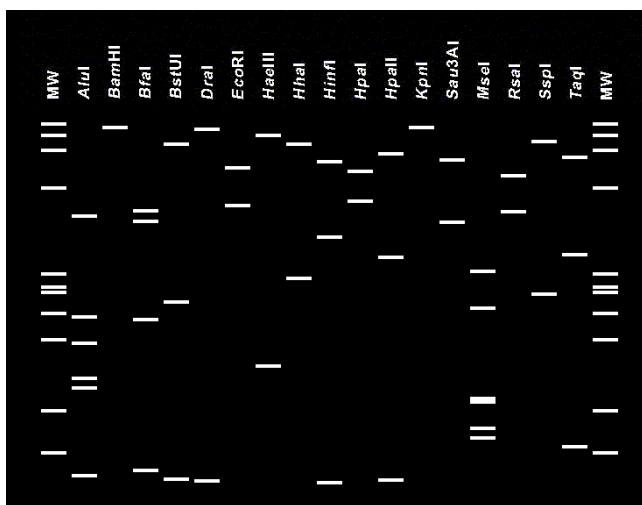
Obr. č. 10: RFLP profily R16F2/R16R2 produktů vzorků CZ3777 a CZ3782



Legenda: dráha L: standard molekulové váhy (Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas); dráha A1, A2: PCR - produkt vzorku CZ3782 z pcháče; dráha C1, C2: PCR - produkt vzorku CZ3777 ze svlačce

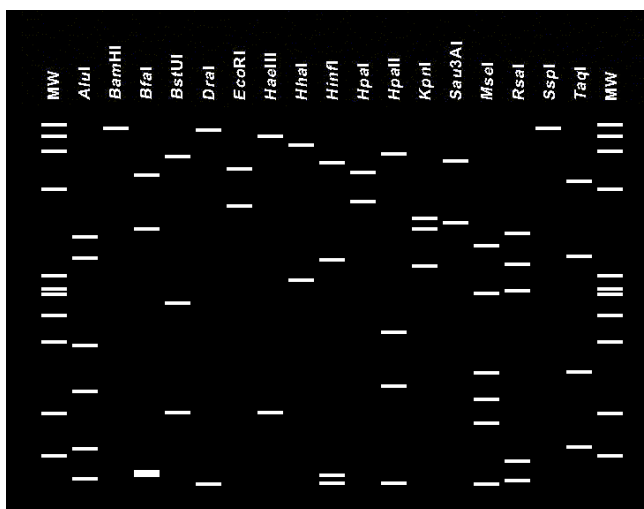
Ze získaných sekvencí DNA jsem pomocí specializovaného nástroje iPhyClassifier ověřila identitu fytoplazem. Na základě porovnání homologie sekvencí R16F2/R16R2 (cca 1 200 bp) vzorků CZ3777 a CZ3782 s referenčními sekvencemi v databázi bylo zjištěno, že vzorek CZ3777 vykazoval 99,9% similaritu s '*Ca. Phytoplasma mali*' (Acc. no. AJ542541) a vzorek CZ3782 vykazoval 99,4% similaritu s '*Ca. Phytoplasma solani*' (Acc. no. AF248959). Byly zjištěny virtuální RFLP profily sekvencí R16F2/R16R2 (cca 1 200 bp) vzorků CZ3777 a CZ3782 (Obr. č. 11, 12), které byly porovnány s restričními profily konkrétních skupin fytoplazem.

Obr. č. 11: Virtuální restrikční profily R16F2/R2 sekvence 16S rDNA vzorku CZ3777 (svlačec rolní)



MW: marker PhiX174 DNA_HaeIII Marker (Fermentas); profily s restrikčními enzymy *MseI* a *RsaI* zvýrazněny.

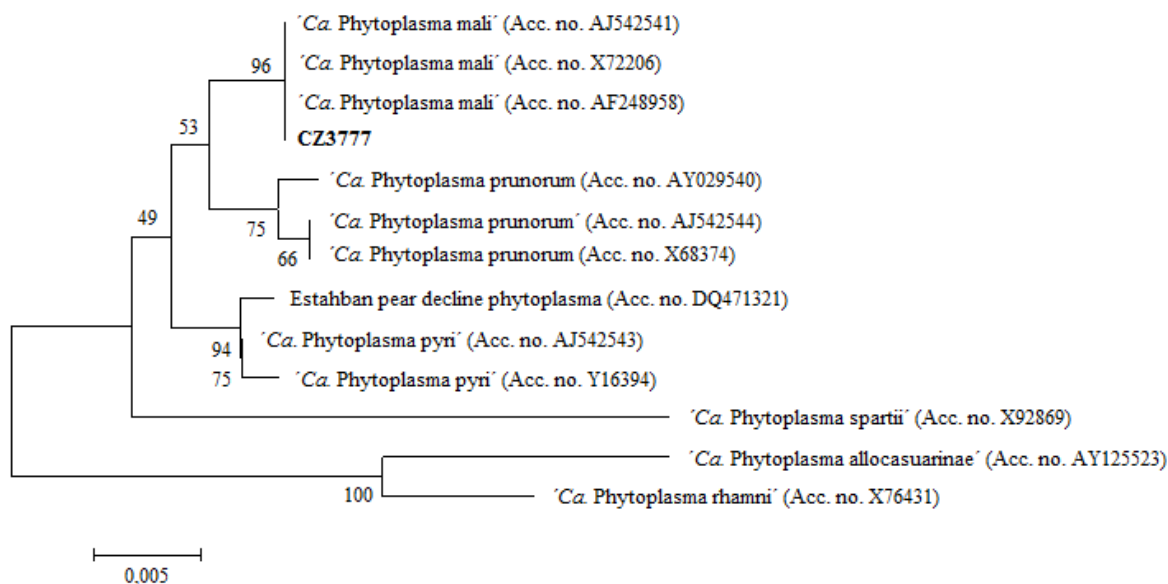
Obr. č. 12: Virtuální restrikční profil R16F2/R2 sekvence 16S rDNA vzorku CZ3782 (pcháč oset)



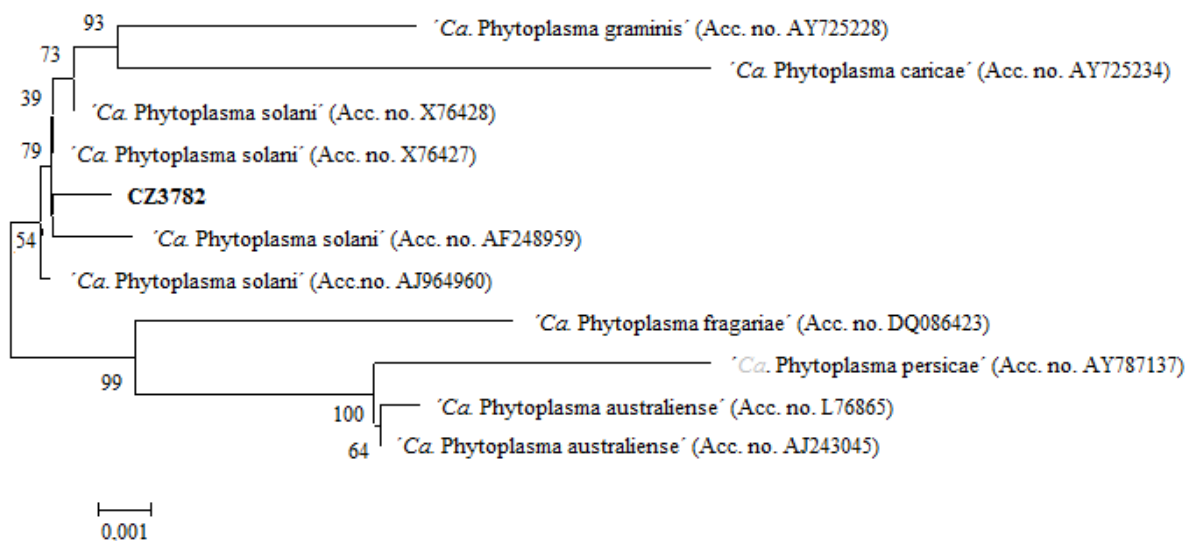
MW: marker PhiX174 DNA_HaeIII Marker (Fermentas); profily s restrikčními enzymy *MseI* a *RsaI* zvýrazněny.

Další analýza vzorků CZ3777 a CZ3782 byla provedena seřazením získaných sekvencí R16F2/R2 genu 16S rRNA mnohočetným aligmentem v programu ClustalW (MEGA 5.0) spolu se sekvencemi vybraných z databáze GenBank. Pomocí metody neighbor-joining byla stanovena příbuznost izolátů. Výsledným zpracováním jsou dendrogramy (Obr. č. 13, 14).

Obr. č. 13: Dendrogram znázorňující fylogenetickou příbuznost fytoplazem skupiny 16SrX a izolátu CZ3777 z pcháče (tučně zvýrazněno).



Obr. č. 14: Dendrogram znázorňující fylogenetickou příbuznost fytoplazem skupiny 16SrXII a izolátu CZ3782 ze svlačce (tučně zvýrazněno).



Dendrogramy jsou sestaveny pomocí neighbor-joining analýzy, jednotlivé analýzy jsou označeny daným Acc.No. Úsečka znázorňuje procento substitucí, u nichž jsou zobrazeny hodnoty bootstrap. Izoláty CZ3777 a CZ3782 byly srovnány s vybranými izoláty ze sbírky Navrátil *et al.* (2008).

Z uvedených dendrogramů opět vyplývá, že izolát CZ3777 z pcháče je fytoplazma příbuzná 'Ca. Phytoplasma mali' a izolát CZ3782 ze svlačce je fytoplazma příbuzná 'Ca. Phytoplasma solani'.

6. Diskuse

Cílem bakalářské práce bylo, kromě vypracování literární rešerše na téma molekulárně-biologická charakteristika fytoplazem ze skupiny žloutenky jilmu (16SrV) infikujících plevelů na jižní Moravě, izolovat a identifikovat fytoplazmy z plevelů pcháče osetu (*Cirsium arvense* (L.) Scop) a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis* (L.)), které byly sesbírány na jižní Moravě v katastru obce Lednice a vykazovaly charakteristické příznaky fytoplazem (chloróza, proliferace, zakrnělost). Pomocí molekulárních metod ('nested' PCR, RFLP analýza, klonování, sekvencování) byly u obou izolátů z pcháče (CZ3777) a ze svlačce (CZ3782) získány sekvence R16F2/R16R2 genu 16S rRNA, z jejichž analýzy pomocí BLAST vyplývalo, že patří k různým skupinám fytoplazem. Izolát CZ3777 vykazoval 99% shodu s fytoplazmou '*Candidatus Phytoplasma mali*' (16SrX-A) a izolát CZ3782 99% shodu s fytoplazmou '*Ca. Phytoplasma solani*' (16SrXII). Toto taxonomické zařazení potvrdila i gelová RFLP analýza PCR-produktů R16F2/R16R2, virtuální štípání získaných sekvencí programem iPhyClassifier i vytvoření dendrogramu pro jednotlivé izoláty srovnáním s referenčními fytoplazmami taxonomických skupin Apple proliferation (16SrX) a skupinou stolburu (16SrXII).

V České republice byl na jižní Moravě prováděn dlouhodobý výzkum fytoplazem na hospodářských i planých rostlinách, který potvrdil výskyt několika druhů fytoplazem z různých taxonomických skupin (Fránová *et al.*, 2004; Kučerová *et al.*, 2007; Navrátil *et al.*, 2007; Ludvíková *et al.*, 2011; Šafářová *et al.*, 2011)

Práce Pavla Flídra z roku 2010 byla zaměřena na molekulární detekci a identifikaci fytoplazem izolovaných z pcháče osetu a svlačce rolního, kde byly na těchto plevelích s příznaky chlorózy a proliferace identifikovány pomocí různých částí sekvence 16s rRNA genu fytoplazmy ze skupiny 16SrIII a 16SrXII, mimo to i fytoplazmy skupiny Elm yellows (16SrV). Nález fytoplazmy EY na plevelích je zatím ojedinělý. Fytoplazma EY (16SrV-A) byla v ČR potvrzena zatím pouze na jilmu habrolistém (Navrátil *et al.*, 2009) a na ostružiníku maliníku (16SrV-C) (Navrátil *et al.*, 2008).

Předložená bakalářská práce byla proto v teoretické části zaměřena na skupinu Elm yellows. Výsledky experimentální části ovšem v analyzovaných izolátech z pcháče a svlačce nepotvrdily fytoplazmy ze skupiny EY, ale fytoplazmy skupiny Apple proliferation a skupinu stolburu.

Přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně (AP) na pcháči můžeme pokládat za ojedinělý nález. Fytoplazma proliferace jabloně má poměrně úzký okruh hostitelů, který

se omezuje většinou na zástupce rodu *Malus* (Morton *et al.*, 2003). Podle údajů ze sekvencí uvedených v GenBank se může vyskytovat i v rodě *Prunus* (*P. avium*, *P. domestica*, *P. armeriaca*) a v keřích červeného rybízu (*Ribes rubrum*) (Navrátil *et al.*, 2009). Na bylinných hostitelích je výskyt fytoplazmy AP poměrně vzácný. Experimentálně se dá přenést na hostitelskou rostlinu fytoplazem barvíněk růžový (*Catharanthus roseus*) a na *Nicotiana occidentalis* (Genbank; Musseti *et al.*, 2011). V Polsku byl zaznamenán výskyt fytoplazmy proliferace jabloně na hybridech orientální lilie (*Lilium* sp.) (Kamińska a Śliwa, 2008a) a na jiřině (*Dahlia cultorum*) byla zjištěna smíšená infekce fytoplazmy proliferace jabloně (16SrX-A) a fytoplazmy žloutenky astry (16SrI-B) (Kamińska a Śliwa, 2008b).

Přítom pcháč oset (*Cirsium arvense* L.) může být hostitelem celé řady rostlin - v Evropě byl již dříve zaznamenán výskyt fytoplazem skupin aster yellows 16SrI (Jomantiene *et al.*, 1999), western X-disease 16SrIII-B (Rančič *et al.*, 2005), stolburu 16SrXII (Navrátil *et al.*, 2008) a white leaf 16SrXIV (Marcone *et al.*, 2004). Poprvé na území ČR byly na pcháči, rostoucím v okolí obce Lednice na jižní Moravě, detekovány fytoplazmy, které vykazovaly nejvyšší podobnost se skupinami 16SrXIV (Bermuda grass white leaf, shoda 95%) nebo 16SrXI (Rice yellow dwarf, dle virtuální RFLP analýzy). Předpokládá se, že jsou to buď nové druhy fytoplazem řadící se do jedné z těchto skupin, nebo se může jednat i o zcela nový druh fytoplazmy (Pospíchalová, 2012).

Naproti tomu výskyt fytoplazmy stolburu v izolátu CZ3782 ze svlačce můžeme pokládat v rámci ČR za zcela běžnou infekci. Tento patogen se hojně vyskytuje především na jižní Moravě a způsobuje ekonomické ztráty u řady hospodářsky důležitých plodin (réva vinná, brambor, rajče, paprika, celer) a napadá i plevelné rostliny rostoucí v blízkosti polí – svlačec (*Convolvulus arvensis*), pcháč (*Cirsium arvense*) a kopřivu (*Urtica dioica*) (Fialová *et al.*, 2009; Navrátil *et al.*, 2009).

Výzkum zaměřený na volně rostoucí rostliny, vykazující fytoplazmové příznaky, detekována fytoplazmu skupiny 16SrI-B a C, a to na *Matricaria chamomilla*, *Plantago lanceolata*, *Plantago media*, *Silene latifolia* ssp. *alba*, *Stellaria media*, *Taraxacum officinale*, *Thlaspi arvense*, *Tragopogon pratensis*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. hybridum*, *Tripleurospermum maritimum*, and *Verbascum densiflorum*. (Válová *et al.*, 2002).

7. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem zpracovala literární rešerši specializující se na oblast výskytu, taxonomii a genetickou variabilitu fytoplazem skupiny Elm yellows (16SrV).

V experimentální části byla ve vzorcích DNA izolované z plevelů pcháče osetu (*Cirsium arvense*, izolát CZ3777) a svlačce rolního (*Convolvulus arvensis*; izolát CZ3782), rostoucích na jižní Moravě a vykazujících chlorózu, proliferaci a zakrnělost, detekovány fytoplazmy pomocí 'nested' PCR s univerzálními primery P1/P7 a R16F2/R16R2. Identifikace fytoplazem byla provedena sekvencováním R16F2/R16R2 DNA fragmentů ribozomálního genu 16S rRNA.

Původně předpokládaný výskyt fytoplazmy EY na plevelech nebyl potvrzen. V izolátu CZ3777 z pcháče byla zjištěna fytoplazma '*Candidatus* Phytoplasma mali' (16SrX-A) a v izolátu CZ3782 '*Ca. Phytoplasma solani*' (16SrXII-A).

Taxonomické zařazení fytoplazem z analyzovaných izolátů bylo potvrzeno i gelovou RFLP analýzou PCR-produktů R16F2/R16R2, virtuálním štípáním získaných sekvencí programem iPhyClassifier a vytvořením dendrogramu srovnáním DNA sekvence R16F2/R2 z izolátů s referenčními fytoplazmami taxonomických skupin Apple proliferation (16SrX) a skupinou stolburu (16SrXII).

8. Seznam použité literatury

- 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.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., Foissac, X. (2007): Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasmas strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4001-4010.
- 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.
- Baker, W. L. (1948): Transmission by leafhoppers of the virus causing phloem necrosis of American elm. *Science* 108, 307-308.
- Bojnansky, V. (1969): Elm witches'-broom, a new disease in Czechoslovakia. 6th Proceedings of the Conference of the Czechoslovak Plant Virologists, Olomuc, Czechoslovakia. High Tatras, Czechoslovakia, 211-3.
- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., Boudon-Padieu, E. (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42, 151-157.
- Cvrković, T., Jović, J., Mitrović, M., Petrović, A., Krnjajić, S., Malembic-Maher, S., Toševski, I. (2008): First report of alder yellows phytoplasma on common alder (*Alnus glutinosa*) in Serbia. *Plant Pathology* 57, 773.
- Červená, G., Nečekalová, J. (2007): Fytoplazmy na révě vinné. - Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou. http://eagri.cz/public/web/file/58531/Fytoplazmy_na_reve.pdf
- Daire, X., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103, 507-514.
- de Fluiter, H. J., van der Meer, F. A. (1953): Rubus stunt, a leafhopper borne virus disease. *Tijdschr Plantenziekten* 59, 195-197.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. *Journal of Microbiological 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 witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33, 259-266.
- 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.
- Flídr, P. (2010): Výskyt a molekulární charakteristika fytoplazem vyvolávajících žloutenku pcháče (*Cirsium arvense*). Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Fránová, J. (2008): Metody detekce fytoplazmový onemocnění. In: Navrátil M., Fialová R. (eds.): Fytoplazmy - významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 35.

- Fránová, J., Paltrinieri, S., Botti, S., Šimková, M., Bertaccini, A. (2004): Association of Phytoplasmas and Viruses with Malformed Clovers, *Folia Microbiol.* 49 (5), 617–624.
- Gundersen, D. E., Lee I. M., Schaff, D. A., Harrison N. A, Chang, C. J., *et al.* (1996): Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int.J. Syst. Bacteriol.* 46, 64–75.
- Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E., Kingsbury, D. T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176, 5244–54.
- Herath, P., Hoover, G. A., Angelini, E., Moorman, G. W. (2010): Detection of elm yellows phytoplasma in elms and insects using real-time PCR. *Plant Dis.* 94, 1355-1360.
- Jacobs, K., Lee, I., Griffiths, H., Miller, F., Jr., Bottner, K. (2003): A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Dis.* 87, 241-246.
- Jomantiene, R., Staniulis, J., Antoniuk, L., Davis, R. E. (1999): New phytoplasma associated with *Cirsium* yellows disease contains the same 16S rDNA sequence as rrnA of clover phyllody phytoplasma. Unpublished.
- Jung, H. Y., Sawayanagi, T., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Oshima, K., Miyata, S., Ugaki, M., Hibi, T., Namba, S. (2003): ‘*Candidatus* Phytoplasma ziziphi’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1037-1041
- Kamala-Kannan, S., Han, S. S., Lee, K. J., Velmurugan, P., Lee, Y. H. (2011): Association of elm yellows subgroup 16SrV-B phytoplasma with a disease of *Hovenia dulcis*. *J. Phytopathology*, 159, 171-174.
- Kamińska, M., Śliwa, H. (2008a): First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’ in oriental lilies and its association with leaf scorch in Poland. *Plant Pathology* 57, 363.
- Kamińska, M., Śliwa, H. (2008b): Mixed infection of dahlia plants in Poland with apple proliferation and aster yellows phytoplasmas. *Plant Pathology* 57, 363.
- Kapitola, P., Růžička, T., Kroutil, P., Praha (2011): Státní rostlinolekářská zpráva, Karantenní škodlivé organismy na lesních dřevinách, [www.srs.cz, http://eagri.cz/public/web/file/129866/A5_publicace_web.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/129866/A5_publicace_web.pdf).
- Kollar, A., Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 141, 395-401.
- Kučerová, J., Karešová, R., Navrátil, M., Válová, P. (2007): Seasonal occurrence of ‘*Candidatus* Phytoplasma pyri’ in pear trees in the Czech Republic. *Bulletin of Insectology* 60, ISSN 1721-8861.
- Kuske, C. R., Kirkpatrick, B. C. (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, I. M, Gundersen, D. E., Davis, R. E., Chiykowski, L. N. (1992): Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with Canadian peach (eastern) X-disease, western X-disease, and clover yellow edge. *J. Bacteriol.* 174, 6694–98.
- Lee, I. M., Davis R. E. (1988): Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 303–10.
- Lee, I. M., Gundersen, D. E., Hammond, R. W., Davis, R. E. (1994): Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84, 559–66.

- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertaccini, A. (1998b): Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88, 1359–1366.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. M. (1998a): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48, 1153–1169.
- Lee, I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834 – 842.
- Lee, I. M., Martini, M., Marcone, C., Zhu, S. F., (2004): Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 337–347.
- Lee, I. M., Zhao, Y., Davis, R. E., Wei, W., Martini, M. (2007): Prospect of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 60, 239-344.
- Lim, P. O., Sears, B. B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171, 5901-5906.
- Lim, P. O., Sears, B. B. (1991): DNA sequence of the ribosomal protein genes rp12 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiol Letters* 84, 71–73.
- Lim, P. O., Sears, B. B., Klomparens, K. L. (1992): Membrane properties of a plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Journal of Bacteriology* 174, 682–686.
- Lorenz, K. H., 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.
- Ludvíková, H., Fránová, J., Suchá, J. (2011): Phytoplasmas in apricot, peach and sour cherry orchards in East Bohemia, Czech Republic. *Bulletin of Insectology* 64, S67-S68, ISSN 1721-8861.
- Malembic-Maher, S., Salar, P., Filippin, L., Carle, P., Angelini, E., Foissac, X. (2011): Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of '*Candidatus Phytoplasma rubi*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2129–2134.
- Marcone C., Schneider, B., Seemüller E. (2004): '*Candidatus Phytoplasma cynodontis*', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1077–1082.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805–810.
- Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E. (1996): Detection of an elm yellows-related phytoplasma in eucalyptus trees affected by little-leaf disease in Italy. *Plant Dis* 80, 669–673.
- Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E. (1997): Identification and characterization of the phytoplasma associated with elm yellows in southern Italy and its relatedness to other phytoplasmas of the elm yellows group. *Eur J Forest Pathol* 27, 45–54.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P. A., Benedetti, R., Bertaccini, A. (2002): Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol Cell Probes* 16, 197–208.
- Maürer, R., Seemüller, E. (1994): Nature and genetic relatedness of the mycoplasma-like organism causing rubus stunt in Europe. *Plant Pathol* 44, 244–249.

- Maürer, R., Seemüller, E., Sinclair, W. A. (1993): Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms affecting elm, alder, and ash in Europe and North America. *Phytopathology* 83, 971–976.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., de Leeuw, G. T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marvitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M., Seemüller, E. (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: *The Mycoplasmas*, vol. 5. Academic Press, New York, 545–640.
- Mori, N., Bressan, A., Martini, M., Guadagnini, M., Girolami, V., Bertaccini, A., (2002): Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two Flavescence dorée type phytoplasmas. *Vitis* 41, 99-102.
- Morton, A., Davies, D. L., Blomquist, C. L., Barbara, D. J. (2003): Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology* 4, 109-114.
- Murolo, S., Romanazzi, G. (2008): Infection of *Candidatus* phytoplasma ulmi in *Ulmus parvifolia*, *Ulmus* sp. and *zelkova serrata* trained as bonsais. *Journal of Plant Pathology* 90 (2), 345-349.
- Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Martini, M., Paduano, C., Osler, R. (2011): Interactions between 'Candidatus Phytoplasma mali' and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. *Journal of Applied Microbiology* 110, 746-756.
- Navrátil, M., Příbylová, J., Válová, P., Fialová, R., Šafářová, D., Špak, J., Kubelková, D., Petržík, K., Karešová, R., Špaková, V. (2007): Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*. *Bulletin of Insectology* 60, 123-124.
- Navrátil, M., Šafářová, D., Válová, P., Fránová, J., Šimková, M. (2009): Phytoplasma Associated with Witches'-broom Disease of *Ulmus minor* Mill. in the Czech Republic: Electron Microscopy and Molecular Characterization. *Folia Microbiologica* 54 (1), 37-42.
- Navrátil, M., Válová, P. (2004): Fytoplazma žloutenky jilmu [Elm yellows phytoplasma]. *Rostlinolékař*, 6 (příloha, 2 strany).
- Navrátil, M., Válová, P. (2008): Fytoplazmy - obligátní intrabuněčné patogeny. In: Navrátil M., Fialová R. (eds.): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 19.
- Niemark, H., Kirkpatrick, B. C. (1993): Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7, 21–28.
- Ohashi, A., Nohira, T., Yamaguchi, K., Kusunoki, M. & Shiomi, T. (1996): Jujube (*Zizyphus jujuba*) witches' broom caused by phytoplasma in Gifu prefecture. *Trans For Soc Jpn* 107, 309–310.
- Pavan, F. (2000): Occurrence on elm and phenology of Auchenorrhyncha potential vectors of the phytoplasma associated with elm yellows disease. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, Vol. 32, No. 1, 59-68.
- Pospíchalová, R. (2012): Molekulárně-biologická charakteristika fytoplazem ze skupiny Bermuda white leaf (16SrXIV) infikujících plevele na jižní Moravě. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Rančić, D., Paltrinieri, S., Toševski, I., Petanovic, R., Srešanović, B., Bertaccini, A., (2005): First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology* 54, 561.
- Razin, S., Yogevev, D., Naot, Y. (1998): Molecular biology and pathology of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094–1156.

- Růžička, T. (2008): Fytoplazmy jako karanténní patogeny. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds.): Fytoplazmy – významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 44-61.
- Sears, B. B., Kirkpatrick, B. C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. Phylogenetic insights may provide the key to culturing phytoplasmas. *ASM News* (Washington), Vol. 60 No. 6, 307-312
- 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.
- Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K. H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B. B., Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 440-446.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B., Seemüller, E., (1993): Classification of plantpathogenic mycoplasma-like organisms usány restriction-site analysis of PCR amplified 16s rDNA, *Journal of General Microbiology* 139, 519-527.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Razin, S., Tully, J. G. (eds.): *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. New York, Academic Press, pp. 369-380.
- Sinclair, W. A., Townsend, A. M., Griffiths, H. M., and Whitlow, T. H. (2000): Responses of six Eurasian *Ulmus* cultivars to a North American elm yellows phytoplasma. *Plant Dis.* 84, 1266-1270.
- Šafařová, D., Lautere, 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, S127-S128, ISSN 1721-8861.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004): ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1243–1255.
- Toth, K. F., Harrison, N., Sears, B. B. (1994): Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 44, 119–124.
- Válová, P., Fialová, R., Navrátil, M., Fránová, J., Šimková, M., Nebesárová, J. (2002): Weed hosts of phytoplasmas in the Czech Republic. *Plant Protect.Sci.* 38, 285–287.
- 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.
- Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L., Rose, J. P., Petzel, H., Oyaizu, D., Yang, L., Mandelco, J. Sechrest, T. G., Lawrence, J., Van Etten, J., Maniloff, C. R. Woese. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171, 6455–6467.

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.

9. Seznam použitých zkratk

Tab. č. 19: Seznam použitých zkratk

Zkratka	Anglický název	Český název
16S rDNA		ribozomální DNA se sedimentačním koeficientem 16S
16S rRNA		ribozomální RNA se sedimentačním koeficientem 16S
Acc. No.	Accession number	identifikační číslo sekvencí v GenBank
bp	base pairs	páry bazí
CTAB		cetyl trimethyl amonium bromid
DAPI		fluorochrom 4–6- diamidino–2–fenylyndol . 2 HCl
DNA	Deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynucleosid triphosphate	deoxynukleozidtrifosfát
EY		
FD	Flavescence dorée	
IRPCM	International Research Programme on Comparative Mycopathology	
kb	kilobase	kilobáze
LB		Luria-Bertani (médiu)
MLOs	Mycoplasma like organisms	organismy podobné mykoplazmám
PCR	Polymerase Chain Reaction	polymerázová řetězová reakce
RFLP	restriction fragment length polymorphism	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
TAE	Tris acetate EDTA buffer	Tris-acetátový EDTA pufr
TBE	Tris borate EDTA buffer	Tris-borátový EDTA pufr

10. Přílohy

Složení použitých roztoků a příprava médií:

Luria-Bertani (LB) médium (250 ml)

Kasein hydrolyzát	2,5 g
Kvasničný autolyzát	1,25 g
Pepton	1,25 g
NaCl	2,5 g
H ₂ O	250 ml
Agar (tuhé LB)	4,5 g

pH 7,2-7,4

(Autoklávovat 25-30min/120°C)

SOC médium pro p-GEM-T kit

Pepton	2,0 g
Kvasničný extrakt	0.5 g
1 mol.l ⁻¹ NaCl	1 ml
1 mol.l ⁻¹ KCl	0,25 ml
2 mol.l ⁻¹ Mg ²⁺ roztok	1 ml
2 mol.l ⁻¹ glukóza	1 ml

Mg²⁺ roztok:

MgCl ₂ .6 H ₂ O	20,33 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	24,65 g

(Doplnit vodou do 100 ml.)

Pepton, kvasničný extrakt, NaCl a KCl byl rozpustěn v 97 ml vody, autoklávován a po zchládnutí na pokojovou teplotu byl přidán roztok Mg²⁺ a glukóza. Doplněno sterilní vodou do 100 ml.

TAE purf (1l, 50x zásobní roztok)

TRIS base	242 g
Kyselina octová	57,1 ml
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	37,2 g

(Doplnit vodou do 1l.)

Seznam použitých chemikálií:

- PCR reakce:** deionizovaná voda
dNTP (Promega)
Go Taq™ DNA polymeráza (Promega)
- ELFO:** agaróza (Amresco)
TAE pufr
barvivo GelRed™ (10 000x v DMSO, Biotium)
Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)
0,1% roztok bromfenolové modři v 30% glycerolu
- Izolace DNA z gelu:** QIAquickR Qiagen Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- RFLP:** deionizovaná voda
dNTP (Promega)
Pufr
BSA
Restrikční endonukleáza
- Klonování:** pGem-TR Vector System (Promega)
SOC médium
LB médium
zásobní roztok ampicilinu (100 µg/µl, Sigma-Aldrich)
zásobní roztok X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (20 mg/ml, rozpuštěn v dimethylformamidu)
zásobní roztok IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (200 mg/ml, rozpuštěn v destilované vodě)
- Sekvencování:** Big Dye sequencing terminator kit (PE Biosystems)

Tab. č. 20: Přístrojové vybavení laboratoře

Přístroj	Výrobce
Centrifuga MR 22i	Jouan
Dokumentační zařízení Syngene	Syngene, Ltd.
Dry-block R DB 2D	Techne
Elektroforéza Power Pack P25	Biometra
Flowbox TELSTAR PV-100	Telstar
Fluorometr Hoefer DyNa Quant 200	Hoefer
Hlubokomrazicí box MDF-U52V	Sanyo
Mikrovlnná trouba	Daewoo
Minicentrifuga Spectrafuge mini 25D	Labnet International, Inc.
Nanodrop ND - 1000 (V.3.7.0)	Thermo Scientific
PCR cycler T-Personal	Biometra
Sekvenátor ABI PRISM model 3730	PE Applied Biosystems, USA
SPD SpeedVac SPD111V	Thermo Savant
Spectrafuge 16M	Labnet
Termostatovaná třepačka tm-30, SM-30	Edmund Bühler GmbH
Váhy AaD EK-200G	A&D Co. Ltd.
Vortex MS1 Minishaker	IKA®

Tab. č. 21: Použité PC programy

Program	Výrobce
BLAST	GenBank
ClustalW (MEGA 5.0)	http://www.megasoftware.net/
GeneSnap	Syngene, Ltd.
iPhyClassifier	http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi
Microsoft Excel	Microsoft Office 2010
Microsoft Word	Microsoft Office 2010
Seqman	DNASTAR, Lasergene

Tab. č. 22: Seznam fytoplazem skupiny 16S rV (GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) Soubor sekvencí ribozomálního genu 16Sr RNA z GenBank

Organismus	GenBank Identifikační číslo sekvence	Autor/ rok	Hostitel	Země
Alder yellows phytoplasma	AY028789	Valiunas, D./2001	<i>Alnus glutinosa</i>	Lithuania
	AY197642	Lee, I.M./2004		
	AY197646	Lee, I.M./2004		
	AY197647	Lee, I.M./2004		
	Y16387	Seemüller, E./1998	<i>Alnus glutinosa</i>	Southern Italy
'Ca. Phytoplasma ulmi'	AF122911	Griffiths, H.M./1999	<i>Ulmus rubra</i>	USA
	AF189214	Davis, R.E./1999		New York
	AY197655	Lee, I.M./2004		
	AY197656	Lee, I.M./2004		
	AY197657	Lee, I.M./2004		
	AY197658	Lee, I.M./2004		
	HM038455	Jovic, J./2011	<i>Ulmus minor</i>	Serbia
	HM038456	Jovic, J./2011	<i>Ulmus minor</i>	Serbia
	HM038457	Jovic, J./2011	<i>Ulmus laevis</i>	Serbia
	HM038458	Jovic, J./2011	<i>Ulmus laevis</i>	Serbia
	HM038459	Jovic, J./2011	<i>Ulmus laevis</i>	Serbia
	HM038460	Jovic, J./2011	<i>Ulmus minor</i>	Serbia
	L33763	Gundersen, D.E./1994	<i>Catharanthus roseus</i>	
'Ca. Phytoplasma vitis'	AF176319	Davis, R.E./2001		Francie
	AY197643	Lee, I.M./2004		
	AY197644	Lee, I.M./2004		
	AY197645	Lee, I.M./2004		
'Ca. Phytoplasma ziziphi'	AF279272	Han, M.S./2000	<i>Zizyphus jujube</i>	Korea
	AF305240	Harrison, N.A./2000		Čína
Flavescence doree phytoplasma HD1	AF122912	Griffiths, H.M./1999	<i>Apocynum cannabinum</i>	New York
fytoplazma JWB-G1	AB052876	Jung, H.Y./2007		Japonsko
fytoplazma JWB-Ko	AB052879	Jung, H.Y./2007		Korea
Hemp dogbane yellows phytoplasma	AY197654	Lee, I.M./2004		
	EF029092	Zhao, Y./2010	<i>Cannabis</i> spp.	Čína
Cherry lethal yellows phytoplasma	AY197659	Lee, I.M./2004		
Jujube witches'-broom phytoplasma	AY197661	Lee, I.M./2004		
	DQ886426	Wu, Y./2006		Čína
	FJ154844	Zhu, X./2008	jujube	Čína
	FJ154845	Zhu, X./2008	jujube	Čína

Tab. č. 22. : Pokračování

Organismus	GenBank Identifikační číslo sekvence	Autor/ rok	Hostitel	Země
	FJ154846	Zhu, X./2008	jujube	Čína
	FJ154847	Zhu, X./2008	jujube	Čína
	FJ573230	Xu, Q./2009	jujube	China: Beijing, Xiangshan
	GU574807	Gao, J./2010		Čína
	GU586972	Li, Z.N./2010	Apple	Čína
	GU594058	Gao, J./2010		Čína
	HM016218	Jian, H./2010	Ziziphus jujuba	Čína
	HM989945	Yu, X.M./2010		Čína
	HM989946	Yu, X.M./2010		Čína
	HM989947	Yu, X.M./2010		Čína
HM989948	Yu, X.M./2010		Čína	
Mycoplasma sp.	X76560	Seemüller, E./2003	transmitted from <i>Vitis vinifera</i> to <i>Vicia faba</i>	Francie
Nectarine yellows phytoplasma	AY332659	Lee, I.M./2003		Indie
New York elm yellows phytoplasma	DQ863282	Jomantiene, R./2006	elm	New York
Paper mulberry witches'-broom phytoplasma	AY576685	Liu, Q./2004		
Peach yellows phytoplasma	AY197660	Lee, I.M./2004		
	AY332658	Lee, I.M./2003		Indie
	HM590624	Mitrovic, J./2010	periwinkle	Itálie
Periwinkle yellows phytoplasma	EU375835	Che, H.Y./2008	<i>Catharanthus roseus</i>	Čína
Phytoplasma sp.	X68376	Seemüller, E./1994		
Rubus stunt phytoplasma	AY197648	Lee, I.M./2004		
	AY197649	Lee, I.M./2004		
	AY197650	Lee, I.M./2004		
	AY197651	Lee, I.M./2004		
	Y16395	Seemüller, E./1998	<i>Rubus fruticosus</i> (wild blackberry)	Southern Italy
Virginia creeper phytoplasma	AF305198	Harrison, N.A./2000		Florida
Wax leaf privet witches'-broom fytoplazma	AB293422	Jung, H.Y./2008	<i>Ligustrum japonicum</i>	Korea