

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2018

Bc. Monika Opatíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně-genetická charakteristika
fytoplazmy žloutenky jilmu
(‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’)**

Diplomová práce

Bc. Monika Opatíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Dany Šafářovej, Ph.D. a za použitia uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa:

Podpis:

Súhrn

Diplomová práca sa zaoberá molekulárne-genetickou charakteristikou fytoplazmy žltáčky brestu (*Candidatus Phytoplasma ulmi*), ktorá predstavuje obligátneho parazita pre rastliny rodu *Ulmus* sp. s rozšírením ako v Eurázii tak aj v Amerike. Na vybranom súbore izolátov tejto fytoplazmy z Českej republiky bola s využitím molekulárnych analytických metód charakterizovaná variabilita *Candidatus Phytoplasma ulmi*, a to na základe šiestich vybraných génov a génových oblastí: 16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY*, *secY-map*, *secA* a *tuf*. Následne bola táto variabilita porovnaná s už popísanou variabilitou pre tento druh detekovanou pri predchádzajúcich štúdiách v rôznych krajinách Európy. Bolo zistené, že táto fytoplazma je v Českej republike značne diverzifikovaná, a síce časť izolátov má blízky pôvod s izolátmi zo Srbska, Chorvátska a Talianska, časť izolátov bola odlišná a vykazovala jedinečnú variabilitu, ktorá doteraz nebola pre túto fytoplazmu detekovaná. Najvyššie rozlíšenie českých izolátov pritom poskytol najvariabilnejší analyzovaný gén *secY*. Využitie *tuf* génu pri multigénovej charakteristike tejto fytoplazmy sa preukázalo vhodné najmä pre doplnujúce analýzy. Analýza *secA* génu pri tejto práci zahŕňala navrhnutie nových primerov špecifických pre túto fytoplazmu a preukázala ich vysokú spoľahlivosť detekcie. V rámci jednotlivých oblastí bola u izolátov v sekvenciách variabilnejších génov pozorovaná odlišná variabilita, z ktorej sa dá usudzovať na mikroevolúciu tohto patogénu. Zároveň analýzy preukázali prítomnosť celkovo troch zmesných infekcií vo vybranom súbore vzoriek a to u dvoch hmyzích jedincov a u jedného brestu. Táto práca je tak prvou rozsiahlejšou štúdiou prevádzanou v Českej republike zameranou práve na variabilitu *Candidatus Phytoplasma ulmi*.

Summary

The diploma thesis is focused on the molecular and genetic characterization of Elm yellows phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma ulmi*), which is an obligate parasite infecting plants from genus *Ulmus* with its distribution in Eurasia and America. On the collection of isolates from Czech Republic the analysis of variability was performed based on six genes encoding: 16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY*, *secY-map*, *secA* and *tuf* by using molecular methods. The main aim was to compare variability of these isolates and variability of *Candidatus Phytoplasma ulmi* isolates that have been already detected in the others studies all across Europe. It was discovered that *Candidatus Phytoplasma ulmi* is highly diverse in Czech Republic and even when the major part of the isolates has common origin with the isolates from Serbia, Croatia and Italy, the minor part of the isolates was different and has unique variability, that has never been detected before. The highest differentiation of Czech isolates was allowed due to analysis of *secY* – the most variable gene in this study. Using *tuf* gene for multigenetic characterization of this phytoplasma was confirmed as suitable for subsidiary analysis. For analysis of *secA* gene the new specific primers were proposed in this work and their utilization shows their high reliability for detection. Simultaneously, variability of the isolates from different districts in Czech Republic was consistent with the expected microevolution of this pathogen in different areas. Moreover, the analysis proved the presence of three mixed infections in the collection of samples; two were proved for insects and one for elm tree. In conclusion, this diploma thesis is the first larger-scale study focused on variability of Elm yellows phytoplasma in Czech Republic and provides new information about its status in this country.

Podakovanie:

Rada by som sa poďakovala Mgr. Dane Šafářovej, Ph.D. za jej pomoc, odborné vedenie, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri vypracovávaní mojej diplomovej práce. Moja vďaka patrí aj pani Jane Veselskej za jej pomoc pri praktickej časti mojej práce a ďalším ľuďom, ktorí mi svojimi pripomienkami pomohli dokončiť túto prácu. Diplomová práca bola financovaná Internou grantovou agentúrou Univerzity Palackého v Olomouci, projekt číslo IGA_PrF_2017_004 a IGA_PrF_2018_005.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cieľ práce	2
3	Literárny prehľad	3
3.1	Fytoplazmy	3
3.2	Klasifikácia fytoplaziem	3
3.3	‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	4
3.4	Genetická variabilita ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	6
3.5	Pôvod ‘ <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ’ a jej koevolúcia s hostiteľom	8
3.6	Zaradenie ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’ do skupiny 16SrV	9
3.7	Fytoplazmy infikujúce rod <i>Ulmus</i> sp. a štatút ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	10
4	Materiál a metódy.....	11
4.1	Biologický materiál	11
4.2	Použité chemikálie, súpravy a roztoky	12
4.3	Identifikácia fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	14
4.3.1	Elektroforetická separácia	15
4.3.2	RFLP analýza	15
4.4	Genotypizácia izolátov fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	15
4.5	Sangerove sekvenovanie PCR produktov.....	17
4.6	Bioinformatická analýza	18
5	Výsledky.....	19
5.1	Identifikácia fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i> ’	19
5.2	16S rRNA gén.....	20
5.3	SecY-map lokus	22
5.4	Tuf gén.....	25
5.5	SecA gén.....	27
5.6	SecY gén.....	29
5.7	Gény pre ribozomálne proteíny rpl22 a rps3	33
6	Diskusia	36
7	Záver.....	41
8	Literatúra	42

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Virtuálne reštrikčné profily ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma ulmi', gén pre 16S rRNA, iPhyClassifier, typový izolát EY-627 (Acc. No. AY197658)	5
Obrázok 2: <i>Rsa</i> I-RFLP a <i>Mse</i> I-RFLP profily R16F2/R16R2 produktov vybraných izolátov fytoplazmy žltáčky brestu.	20
Obrázok 3: <i>In silico</i> RFLP profily vybraných typových izolátov ' <i>Ca.</i> Phytoplasma ulmi' štiepaných reštrikčnými endonukleázami <i>Rsa</i> I (A), <i>Mse</i> I (B) a <i>Bfa</i> I (C).	21
Obrázok 4: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií secY-map lokusu	24
Obrázok 5: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií tuf génu	26
Obrázok 6: Detekcia SecA-Vf/r produktov vybraných izolátov pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle	27
Obrázok 7: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií secA génu	28
Obrázok 8: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií secY génu	32
Obrázok 9: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií kódujúcich ribozomálne proteíny rpl22 a rps3	35

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Zoznam testovaných vzoriek	11
Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre 'direct' a 'nested' PCR reakcie	14
Tabuľka 3: Podmienky pre 'direct' P1/P7 PCR a 'nested' R16F2/R16R2 PCR reakcie	14
Tabuľka 4: Zloženie reakčnej zmesi pre 'nested' PCR s primermi rp(V)F1A a rp(V)R1A.....	16
Tabuľka 5: Podmienky PCR reakcií pre jednotlivé primery	17
Tabuľka 6: Rozpis primerov použitých pre sekvenovanie jednotlivých PCR fragmentov	18
Tabuľka 7: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltáčky brestu v unikátnom sekvenčnom motíve 16S rRNA génu charakteristickom pre druh ' <i>Ca.</i> Phytoplasma ulmi'	21
Tabuľka 8: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltáčky brestu v unikátnych sekvenčných motívoch secY génu charakteristických pre druh ' <i>Ca.</i> Phytoplasma ulmi'	30
Tabuľka 9: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltáčky brestu v unikátnych sekvenčných motívoch oblasti kódujúcej ribozomálne proteíny rpl22 a rps3 charakteristických pre druh ' <i>Ca.</i> Phytoplasma ulmi'	34

1 Úvod

Fytoplazma žltacky brestu ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ predstavuje najvýznamnejšieho patogéna rastlín rodu *Ulmus* sp. s potvrdeným výskytom v Európe, Ázii a Amerike. U infikovaných rastlín môže vyvolávať jednak (a) symptómové infekcie s príznakmi chlorózy listov, ich predčasného uschýnania a opadania, redukovaný rast rastliny a rozvoj metlovitosti na vetvách, tak aj (b) bezsymptómové infekcie bez viditeľných prejavov príznakov na rastline, pozorované najmä na pôvodom európskych a ázijských brestoch. Môže byť prenášaná neošetreným rastlinným materiálom aj hmyzími vektormi, najmä z rádu *Hemiptera* (napr. *Scaphoideus luteolus*, *Macropsis mendax*). Z molekulárne-genetického hľadiska štúdie variability fytoplazmy žltacky brestov prevádzané v posledných dvoch desaťročiach postupne ukazujú, že pôvodný popis tejto fytoplazmy z roku 2004 je nepresný, a táto fytoplazma je v Európe v skutočnosti diverzifikovanejšia.

Hlavnou náplňou experimentálnej časti diplomovej práce bola multigénová charakteristika ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ na základe analýzy šiestich vybraných génov a génových oblastí: 16S rRNA, *rpl22* a *rps3*, *secY*, *secY-map*, *secA* a *tuf* u vybraného súboru izolátov tejto fytoplazmy pôvodom z Českej republiky. Zaznamenaná variabilita bola následne porovnaná s už popísanou variabilitou tejto fytoplazmy pri predchádzajúcich štúdiách v iných krajinách.

2 Cieľ práce

Cieľom v prvej časti mojej diplomovej práce je stručné vypracovanie literárnej rešerše na tému fytoplazma žltacky brestu (*Candidatus Phytoplasma ulmi*) so zameraním na genetickú variabilitu tejto fytoplazmy.

Cieľom praktickej časti je analýza genetickej variability fytoplazmy žltacky brestu na poskytnutých izolátoch získaných odbermi z jej hostiteľov v Českej republike a následné vyhodnotenie získaných výsledkov s ohľadom na už popísanú variabilitu tejto fytoplazmy v predchádzajúcich štúdiách.

3 Literárny prehľad

3.1 Fytoplazmy

Fytoplazmy sú rastlinné patogénne baktérie bez bunkovej steny prispôbené na striktné parazitický spôsob života. Z fylogenetického hľadiska sú príbuzné gram-pozitívnym baktériám s nízkym obsahom G+C párov bází (Weisburg *et al.*, 1989). Sú zodpovedné za ochorenia stoviek rastlinných druhov po celom svete (Lee *et al.*, 2000) a sú prenášané z rastliny na rastlinu cicavým hmyzom z radu *Hemiptera* (Weintraub *et* Beanland, 2006). Fytoplazmy nie je možné kultivovať a z tohto dôvodu nie je možný ani ich kompletný popis biologických vlastností ako živých organizmov. Preto boli fytoplazmy, podľa dohody navrhutej Murrayom *et* Schleiferom (1994), popísané ako kandidátny taxón ‘*Candidatus Phytoplasma*’ na úrovni druhu.

3.2 Klasifikácia fytoplaziem

Zaradenie fytoplaziem v klasifikačnom systéme organizmov bolo dlho nejasné. Pôvodne boli symptómy vyvolávané týmito patogénmi prisudzované vírusovým infekciám. Neskôr po ich vizualizácii v elektrónovom mikroskope a lepšej charakterizácii boli označované ako mycoplasma like organisms (MLOs), kvôli ich podobnosti s mykoplazmami (Doi *et al.*, 1967). K pochopeniu ich fylogényz viedli až aplikácie molekulárnych technológií. Prvý systém klasifikácie fytoplaziem bol založený na reštrikčnej analýze génu pre 16S rRNA (Murray *et* Schleifer, 1994; Lee *et al.*, 1998). Tento systém umožňuje širokospektrú diferenciáciu a je všeobecne prijímaný pre svoju pomernú jednoduchosť, spoľahlivosť a rýchly spôsob určovania fytoplaziem. Neumožňuje však detailnejšiu diferenciáciu, predovšetkým rozlišovanie fytoplaziem líšiacich sa navzájom z biologického a ekologického hľadiska. V súčasnosti je na základe tejto klasifikácie identifikovaných 33 hlavných 16Sr skupín (I – XXXIII) (Bertaccini *et al.*, 2014). Novší klasifikačný systém založený na sekvenčnej analýze génu pre 16S rRNA a zohľadnení biologických a ekologických charakteristík, viedol k stanoveniu nového taxónu pomenovaného ‘*Candidatus Phytoplasma*’. Pre popis fytoplazmy ako nového druhu pritom platia všeobecné ustanovenia z roku 2004 navrhnuté International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology, IRPCM (Firrao *et al.*, 2004), ktoré nariaďujú, že popis ‘*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*’ druhu musí odkazovať na jedinú, unikátnu 16S rRNA génovú sekvenciu (> 1200 bp) a kmeň môže byť určený za nový druh ak jeho 16S rRNA génová sekvencia má < 97,5% identitu k predošlým popísaným ‘*Ca. Phytoplasma*’ druhom. Avšak na základe doporučení International

Committee of Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the taxonomy of *Mollicutes* môžu byť aj dve fytoplazmy zdieľajúce viac než 97,5% sekvenčnú similaritu v géne pre 16S rRNA rozlíšené ako dva samostatné ‘*Ca. Phytoplasma*’ druhy ak spĺňajú nasledujúce kritériá: (a) sú prenášané odlišnými vektormi, (b) majú odlišných prirodzených rastlinných hostiteľov a (c) je dôkaz o ich vzájomnej molekulárnej diverzite. Takéto fytoplazmy reprezentujú ekologicky vzdialené populácie. (Firrao *et al.*, 2004). Do súčasnej doby je počet ‘*Ca. Phytoplasma*’ druhov 45 vrátane najnovšie popísanej ‘*Candidatus Phytoplasma wodyetiae*’ (Naderali *et al.*, 2017).

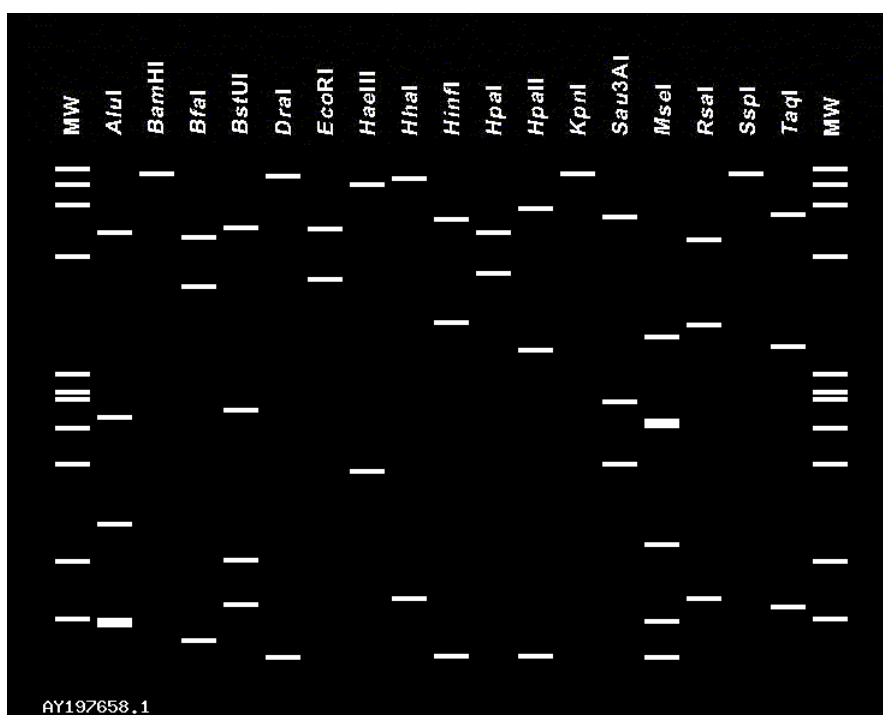
V súčasnosti sú fytoplazmy v taxonómii zaradené do ríše: baktérie (*Bacteria*), kmeň: *Tenericutes*, trieda: *Mollicutes*, rad: *Acholeplasmatales*, čeľaď: *Acholeplasmataceae*, rod: ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (Firrao *et al.*, 2004).

3.3 ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

Jedno z významných fytoplazmových ochorení drevín predstavuje žltáčka brestov. Jej príčinou je infekcia rastlinného organizmu fytoplazmou ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Výskyt tohto ochorenia bol prvýkrát zaznamenaný v USA roku 1938 (Swingle, 1938). Ochorenie označované aj ako ‘elm phloem necrosis’ viedlo v USA v 80. a 90. rokoch 20. storočia k významnému úpadku a poškodeniu *U. americana* L. a *U. rubra* Muhl. (brest červený) (Braun *et* Sinclair, 1979; Matteoni *et* Sinclair, 1985; Griffiths *et al.*, 1999). Na infikovaných brestoch boli pozorované symptómy ako epinastia, žltnutie, zakrpatenie a predčasné uschýnanie a opadávanie listov, redukovaný rast a zakrpatenie celej rastliny, rozvoj metlovitosti (witches’ broom) na vrchole vetvičiek a konároch a predčasné otváranie vegetatívnych pupeňov. Tieto bresty vykazovali vysokú mortalitu a infekcia mala typický epidemický charakter (Braun *et* Sinclair, 1979). Na rozdiel od toho infikované bresty pôvodom z Európy alebo Ázie ako aj ich hybridy, vykazovali nižšiu mortalitu a väčší výskyt bezsymptómových infekcií. Tento trend bol pritom pozorovaný nezávisle na mieste výskytu nálezu infikovaných brestov, to znamená či už v Amerike alebo Európe. Z toho sa dá usudzovať na nižšiu vnímavosť a vyššiu odolnosť pôvodom európskych a ázijských druhov brestov voči tejto infekcii bez ohľadu na ich aktuálny geografický výskyt (Mitterpergher, 2000; Sinclair *et al.*, 2000). V Európe bol výskyt žltáčky brestov potvrdený vo viacerých krajinách vrátane Talianska (Goidanich, 1951; Gualaccini, 1963; Pisi *et al.*, 1981; Marccone *et al.*, 1997), Francúzska (Mäurer *et al.*, 1993; Jarausch *et al.*, 2001), Nemecka (Mäurer *et al.*, 1993), Československa (Kláštorský, 1951; Bojaňanský, 1969) a Srbska (Jović *et al.*, 2008) na breste poľnom (*U. minor* Mill.), breste horskom (*U. glabra* Huds.), breste nízkom (*U. pumila*

L.) a breste vřzovom (*U. laevis* Pall.). V roku 2006 bola v Taliansku prřtornosť tejto fytoplazmy preukázaná aj na breste drobnolistom (*U. parvifolia* Jacq.) (Murolo a Romanazzi, 2008). Ako hmyzí vektor, zodpovedný za šírenie fytoplazmy žltacky brestov, bol v 50. rokoch v USA preukázaný *Scaphoideus luteolus* Van Duzee (Baker, 1949), ktorý sa vřak v Európe nevyskytuje. Preukázaným vektorom tejto fytoplazmy je v Taliansku *Macropsis mendax* Fieber (Carraro *et al.*, 2004). Ako ďalšie potenciálne vektory v Európe boli navrhnuté *Hyalesthes luteipes* Fieber, *Philaneus spumarius* L. a *Allygus atomarius* Fabricius (Jović *et al.*, 2010). V prípade prenosu tejto fytoplazmy rastlinným materiálom, napríklad pri zařtepaní, je možné prevádzať ořetrovanie odrezkov brestov horúcou vodou, aplikovanou na jeseň a následne na jar. Týmto spôsobom je možné produkovať fytoplazmy prostý materiál (Boudon-Padieu *et al.*, 2004).

Fytoplazma žltacky brestov je v rámci staršieho klasifikačného systému zaradená do podskupiny 16SrV-A a to na základe jej charakteristického reřtrikčného profilu získaného řtiepaním R16F2/R16R2 produktu sekvencie 16S rDNA základnými 17-timi reřtrikčnými endonukleázami (Obr. 1). Vzniknutý unikátny reřtrikčný profil umožňuje jej následné odlíšenie od ostatných fytoplaziem spadajúcich do iných skupín a podskupín.



Obrázok 1: Virtuálne reřtrikčné profily ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, gén pre 16S rRNA, iPhyClassifier, typový izolát EY-627 (Acc. No. AY197658)

Legenda: MW: řtandard molekulovej hmotnosti (α X174 DNA řtiepaný *HaeIII*), zvyšné dráhy (2 – 18): enzýmovo špecifické reřtrikčné profily, jednotlivé enzýmy označené skratkou

Detailnejšia analýza využívajúca novší sekvenčný prístup klasifikácie umožnila zaradenie fytoplazmového kmeňa EY1^T, súvisiaceho s ochoreniami amerických brestov, do samostatného druhu ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, pre ktorý je charakteristické: (1) 16SrV-A fytoplazmy zdieľajú menšiu ako 97,5% sekvenčnú similaritu so všetkými známymi fytoplazmami patriacimi do ostatných skupín a súčasne vykazujú 98,2% sekvenčnú similaritu v géne pre 16S rRNA, 93% similaritu v génoch kódujúcich ribozomálne proteíny a 81% similaritu v géne *secY* s Jujube witches’ broom (JWB) phytoplasma (‘*Ca. Phytoplasma ziziphi*’) patriacej do podskupiny 16SrV-B. (2) Fylogenetické analýzy založené na troch génoch indikujú, že 16SrV-A podskupina reprezentuje skupinu jasne odlišnú od 16SrV-B podskupiny v skupine žltacky brestu. Podskupiny 16SrV-A a 16SrV-B môžu byť rozlíšené pomocou PCR pri využití páru primerov špecifických pre podskupinu 16SrV-B (Zhu *et al.*, 1997). (3) Pre podskupiny 16SrV-A a 16SrV-B nie je potvrdený žiadny spoločný rastlinný hosťiteľ či vektor; vektorom kmeňa EY1^T je *Scaphoideus luteolus* (Sinclair *et al.*, 1976).

16SrV-A fytoplazma EY1^T bola na základe smernice vymenovaná za nový druh s nasledovným popisom: ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’:(Mollicutes) NC; NA; O, bez bunkovej steny; NAS (GenBank accession nos AY197655, AY197675, AY197690); jedinečné oligonukleotidové sekvencie pre 16S rRNA (GGAAA⁸²⁷ – ⁸³⁵, CGTTAGTTGCC¹⁰⁹⁸ – ¹¹⁰⁸), *rpl22-rps3* (TTACGCTTGCC²⁸⁴ – ²⁹⁴, CATTAAATAAAATTGCTATT⁷³⁹ – ⁷⁵⁸, AAATTCTATTTCTATGGGAAT⁹¹⁰ – ⁹³²) a *secY* (TTTGATCCAATGTTAA³⁵⁰ – ³⁶⁵, GTCTTTCGGTCATGGATTGA⁵⁹⁵ – ⁶¹⁴, ATTTAGTCTAAT⁶¹⁶ – ⁶²⁷, CAAATAGAACAA¹⁰⁵³ – ¹⁰⁶⁴) gény. P (*Ulmus americana*, phloem); MJ. EY1^T je referenčný kmeň (Lee *et al.*, 2004a).

3.4 Genetická variabilita ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

Pri popise ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ ako nového druhu v roku 2004 bol preukázaný monofyletický pôvod tejto fytoplazmy a bola popísaná relatívne nízka variabilita v rámci samotného druhu (Lee *et al.*, 2004a). Pri neskorších štúdiách vo Francúzsku (Malembic-Maher *et al.*, 2011), Českej republike (Navrátil *et al.*, 2009), Srbsku (Jović *et al.*, 2011) a najnovšie v Chorvátsku (Katanić *et al.*, 2016) však postupne autori pre ten istý fytoplazmový druh preukazovali variabilitu značne vyššiu. Tento jav vznikol v dôsledku toho, že pri popise tejto fytoplazmy bol využitý nízky počet testovaných izolátov pre analýzu a navyše nebola zohľadnená možná geografická variabilita druhu ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’. Vybrané izoláty boli navyše homogénne v géne pre 16S rRNA a ribozomálnych

proteínoch s minimálnou diverzitou v *secY* géne. Preto až výsledkom analýzy viacerých izolátov s odlišným geografickým pôvodom (geograficky vzdialených) bola odhalená vyššia genetická variabilita v rámci druhu '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'.

Štúdie z roku 2009 v Českej republike prevádzané na fytoplazme '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', izolát EYCZ1, potvrdili pre tento izolát prítomnosť jedinečných oligonukleotidových sekvencií charakteristických pre druh '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Súčasne bola pri týchto štúdiách preukázaná u daného izolátu vyššia variabilita, než bola pôvodne pre fytoplazmu žltáčky brestu popísaná, pričom variabilita bola preukázaná aj v typových sekvenciách všetkých testovaných génov druhu '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Jednalo sa tak o prvé spochybnenie univerzálneho využitia týchto sekvencií pri jedinečnej identifikácii fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' (Navrátil *et al.*, 2009). Rozsiahlejšie fylogenetické štúdie zamerané na genetickú variabilitu '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' prevádzané v Srbsku potvrdili monofyletický pôvod všetkých študovaných izolátov tejto fytoplazmy, ale taktiež indikovali existenciu fylogenetической divergencie v rámci skupiny a existenciu viac ako jednej fylogenetической línie '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Kombinované analýzy 4 génov (16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY* a *secY-map*) viedli k rozlíšeniu 4 subtypov '*Ca. Phytoplasma ulmi*': EY-S1 až EY-S4 (Jović *et al.*, 2011). Fylogenetické štúdie v Chorvátsku preukázali u izolátov takisto vyššiu variabilitu vo všetkých študovaných génoch oproti pôvodnej práci a viedli k zoskupeniu analyzovaných izolátov do jednej skupiny. Prítomnosť izoláty z Chorvátska patrili do jednej fylogenetической línie a ako bolo očakávané na základe geografických podmienok, boli blízko príbuzné k izolátom zo Srbska (Katanić *et al.*, 2016). V tejto komplexnej fylogenetической analýze sa porovnávaný izolát EYCZ1, popísaný v roku 2009, vyčlenil do samostatnej línie, čo naznačuje väčšiu divergenciu tejto fytoplazmy.

Analýzy zamerané na genetickú variabilitu v rámci samotného druhu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' navyše preukázali efektivitu využitia jednotlivých génov pre jeho detailnejšiu charakterizáciu. Analýza vysoko konzervatívnych 16S rDNA sekvencií izolátov viedla v Chorvátsku k detekcii dvoch genotypov, EY-16S-1 a EY-16S-2, pričom izoláty zo Srbska boli identické s genotypom EY-16S-1. Došlo tak k rozčleneniu druhu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' do dvoch fylogenetických línií. Variabilita v tejto oblasti je však minimálna a predstavuje ju iba minimálny počet zmien, najčastejšie v podobe jednonukleotidového polymorfizmu (SNP), a preto nemôže slúžiť pre detailnejšie rozlíšenie (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Rozsiahlejšiu diferenciáciu poskytla fylogenetická analýza oblasti kódujúcej ribozomálne proteíny *rplV* (*rpl22*) a *rpsC* (*rps3*). Táto oblasť vykazovala menšiu konzervatívnosť v porovnaní so 16S rDNA a bola vhodná pre detailnejšiu diferenciáciu a rozlíšenie biologicky

a/alebo ekologicky vzdialených kmeňov fytoplazmy. Analýzy srbských izolátov umožnili rozlíšiť na základe tejto oblasti dve fylogenetické línie rpV-EY1 a rpV-EY2 (Jović *et al.*, 2011), v Chorvátsku všetky izoláty patrili do línie rpV-EY2 a v rámci samotnej línie bolo rozlíšených 5 genotypov, EY-rp-1 až EY-rp-5 (Katanić *et al.*, 2016). Ako najvariabilnejší gén v porovnaní s ostatnými študovanými génmi sa preukázal *secY* gén. Tento gén, lokalizovaný na vzdialenejšej oblasti *spc* operónu a kódujúci podjednotku proteínu translokázy SecY, umožnil najdetailnejšiu diferenciáciu izolátov tejto fytoplazmy. Na základe analýzy *secY* v Srbsku boli rozlíšené 2 fylogenetické línie, SecY-EY1 a SecY-EY2 (Jović *et al.*, 2011), štúdie tohto génu v Chorvátsku viedli k detekcii izolátov patriacich do línie SecY-EY2, pričom v rámci tejto línie rozlíšili izoláty na celkovo 24 genotypov (Katanić *et al.*, 2016). Ďalšou variabilnou oblasťou využitou pri štúdiách na '*Ca. Phytoplasma ulmi*' je lokus *secY-map*, ktorý nesie *map* gén kódujúci metionín aminopeptidázu. Analýza tejto oblasti u izolátov z Talianska a Francúzska viedla k rozdeleniu týchto izolátov do dvoch homogénnych kmeňových klasterov EY1 a EY2, pričom v oboch skupinách boli prítomné izoláty z oboch krajín. Genetická diverzita zistená na základe analýzy tohto lokusu bola prítomná v zhode s taxonomickým statusom '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Boudon-Padiou *et al.*, 2004; Arnaud *et al.*, 2007). Na základe fylogenetickej analýzy lokusu *secY-map* boli v Srbsku rozlíšené tri línie, Map-EY1 až Map-EY3 (Jović *et al.*, 2011). V Chorvátsku boli na základe analýzy tohto lokusu detekované izoláty spadajúce do línie Map-EY3, v rámci ktorej bolo rozlíšených 7 genotypov, EY-map-1 až EY-map-7 (Katanić *et al.*, 2016).

Štúdie zo Srbska aj Chorvátska prítomne preukázali prítomnosť mutácií v typových sekvenciách všetkých troch génoch 16S rRNA, *rpl22-rps3* a *secY*, unikátnych pre '*Ca. Phytoplasma ulmi*' čo je v zhode so štúdiami z Českej republiky (Navrátil *et al.*, 2009; Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Z tohto dôvodu bolo navrhnuté, aby súčasné poznatky o tejto fytoplazme boli znovu zhodnotené s dôrazom na verifikáciu, korekciu a/alebo aktualizáciu druhovo-špecifických oligonukleotidových sekvencií. S tým súvisí aj potreba prehodnotiť a aktualizovať používané kombinácie reštrikčných endonukleáz pri RFLP analýze pre jedinečnú fytoplazmovú identifikáciu druhu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Jović *et al.*, 2011).

3.5 Pôvod '*Ca. Phytoplasma ulmi*' a jej koevolúcia s hostiteľom

Niekoľkoročné štúdie zamerané na variabilitu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' viedli k navrhnutiu hypotézy, že pôvod tejto fytoplazmy je v Európe. Značné množstvo fylogeneticky príbuzných ale vysoko variabilných kmeňov '*Ca. Phytoplasma ulmi*' spolu

s ich relatívne nízkym dopadom na bresty v Chorvátsku by mohlo túto hypotézu podporovať. Pre overenie európskeho pôvodu tohto patogénu je ale potrebné analyzovať viac kmeňov práve zo Severnej Ameriky a nie len z Európy (Jovic *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016).

Ďalšie štúdie naznačujú, že fytoplasma žltacky brestov nepredstavuje priame riziko pre bresty a to pravdepodobne v dôsledku dlhej koevolúcie patogénu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' s jej hostiteľom brestom väzovým (*U. leavis* Pall.). Takýto prípad balancovaného parazitizmu sa typicky prejavuje častými bezsymptómovými infekciami pozorovanými u európskej populácie brestov. Avšak pri sporadickom prenose tohto patogénu na vnímavého hostiteľa môže vzniknúť riziko adaptácie na takéhoto hostiteľa a v konečnom dôsledku viesť k vzniku novej podskupiny fytoplazmy spôsobujúcej ochorenie so závažným ekonomickým dopadom. Takýto prípad bol zaznamenaný pre Alder yellows phytoplasma (AldY) a jej prirodzeného hostiteľa jeľšu lepkavú (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). Analýzou genetickej variability sa preukázalo, že pri prenose AldY na vinič došlo k adaptácii patogénu na nového vnímavého hostiteľa a vzniku nových druhov fytoplaziem spôsobujúcich ochorenia flavescence dorée (FD) a Palatine grapevine yellows (PGY) (Arnaud *et al.*, 2007; Holz *et al.*, 2016). Avšak potenciálna možnosť nového posunu z prirodzených fytoplazmových rezervoárov na ekonomicky významné rastliny sa predikuje veľmi problematcky.

3.6 Zaradenie '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' do skupiny 16SrV

'*Candidatus Phytoplasma ulmi*' patrí do 16SrV skupiny označovanej tiež ako 'Elm yellows group' (EY), pričom táto skupina predstavuje tretí najväčší fytoplazmový klaster (Gundersen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000). 16SrV skupina je veľmi variabilná a patria sem kmene, ktoré sa medzi sebou značne líšia okruhom svojich rastlinných hostiteľov, hmyzími vektormi a geografickou distribúciou. Hostiteľov fytoplaziem z tejto skupiny predstavujú predovšetkým brest, jeľša, vinič, černice, čerešne, broskyne, eukalyptus, druh *Spartium*. Ich rozšírenie bolo potvrdené v Amerike, Európe a Ázii (de Fluiter *et van der Meer* 1953; Daire *et al.*, 1993; Mäurer *et Seemüller*, 1995; Marcone *et al.*, 1996a; 1996b).

16SrV skupina je veľmi rozmanitá. Na základe analýzy variability sekvencií génov pre 16S rRNA, ribozomálne proteíny rpl22 a rps3 a *secY* (Lee *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 1999; Davis *et Dally*, 2001) bola rozdelená do 5 podskupín. Podskupiny odlišené práve na základe génov pre ribozomálne proteíny alebo *secY* sú zhodné s ich špecifickými ekologickými nikami. Špecifický rastlinný hostiteľ, vektor, poprípade geografická oblasť predstavovali ekologické obmedzenia, ktorých vplyvom sa fytoplazmy tejto skupiny diferencovali a vytvorili tak skupinu pozostávajúcu zo značne heterogénnych fytoplazmových kmeňov

(Reinert, 1999; Lee *et al.*, 2004a). Patria sem nasledujúce podskupiny: (1) 16SrV-A zahrňujúca izoláty spôsobujúce žltacku brestov, ktoré sú zaradené do druhu ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ (Lee *et al.*, 2004a); (2) 16SrV-B zahrňujúca fytoplazmy Cherry lethal yellows phytoplasma (CLY5) infikujúca čerešne v Číne (Zhu *et al.*, 1997) a Jujube witches’ broom phytoplasma (JWB) spôsobujúca metlovisť čínskych datlí (*Ziziphus* spp.), a ktorá bola neskôršie popísaná ako ‘*Candidatus Phytoplasma ziziphi*’ (Jung *et al.*, 2003); (3) podskupiny 16SrV-C a 16SrV-D zahrňujúce fytoplazmy Alder yellows phytoplasma (AldY) infikujúca jelše v severnej Európe (Mäurer *et al.*, 1993; Marcone *et al.*, 1997); Flavescence doreé phytoplasma, ktorá vyvoláva typické žltnutie viniča v Európe (Daire *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 2005) a Hemp dogbane associated phytoplasma infikujúca *Apocynum cannabinum* L. (Griffiths *et al.*, 1999); (4) 16SrV-E zahrňujúca fytoplazmu Rubus stunt phytoplasma (RuS), ktorá napáda ako divoké tak aj kultivované černice (*Rubus* spp.) v Európe, a ktorá bola neskôr popísaná ako ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ (Malembic-Maher *et al.*, 2011); (5) 16SrV-F zahrňujúca izoláty spôsobujúce metlovisť na *Balanites triflora* Tiegh., ktoré sú zaradené do druhu ‘*Candidatus Phytoplasma balanitae*’ (Win *et al.*, 2013).

3.7 Fytoplazmy infikujúce rod *Ulmus* sp. a štatút ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

Hoci v súčasnosti predstavuje ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ najzávažnejšieho a najrozšírenejšieho patogéna pre rod *Ulmus* (Murolo *et Romanazzi*, 2008), boli dokumentované príležitostné infekcie brestov aj inými fytoplazmami ako sú napr. ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’, ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ a ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ (Lee *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 2003; Credi *et al.*, 2006). To potvrdzuje, že geneticky odlišné fytoplazmy môžu infikovať tie isté rastlinné druhy, a preto je presná identifikácia a typizácia fytoplazmových kmeňov nevyhnutná pre stanovenie príčiny a pôvodu nových výskytov a predikovaní smeru šírenia ochorenia (Arnaud *et al.*, 2007).

Fytoplazma žltacky brestov má značný ekonomický dopad, čím sa stáva predmetom medzinárodnej karantény. V súčasnosti je organizáciou EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) zaradená do A1 listu škodcov, pre ktoré je doporučená regulácia ako karanténnych škodcov (EPPO, 2017).

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

Pri vypracovávaní experimentálnej časti diplomovej práce bola spracovaná DNA z 26 vzoriek brestov (*Ulmus sp.*), 4 vzoriek vošiek *Cacopsylla ulmi* Förster, 1 vzorky méry *Psylla alni* Linnaeus a 1 vzorky peniarky *Aphrophora alni* Fallén, ako hostiteľov 'Candidatus Phytoplasma ulmi'. Vyizolovaná DNA bola získaná v spolupráci s Laboratóriom virológie, Oddelenie diagnostické laboratórium Olomouc, ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský). Jednotlivé vzorky boli získané v rámci prieskumu výskytu fytoplazmy žltacky brestu v Českej republike v rokoch 2015 a 2016, ich súhrn vid' tabuľka 1.

Na klonovanie bola využitá baktéria *Escherichia coli*, kmeň DH5 α (genotyp: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1).

Tabuľka 1: Zoznam testovaných vzoriek

Označenie vzorky/ Rok odberu	Hostiteľ	Lokalita	Príznaky
205/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Nevyhodnotené
516/2015	<i>Ulmus sp.</i>	východné Čechy	Hnedé škvrny na listoch
517/2015	<i>Ulmus sp.</i>	Vrbka u Opavy	Nevyhodnotené
521/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
522/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
523/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
524/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
527/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
624/2015	<i>Ulmus sp.</i>	Velký Vřešťov	Bez symptómov
627/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
628/2015	<i>Ulmus minor</i>	Velký Vřešťov	Bez symptómov
629/2015	<i>Ulmus minor</i>	Vilantice	Bez symptómov
336/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Úlibice	Zvinovanie a chloróza listov
337/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Valdice	Bez symptómov
338/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Úlibice	Bez symptómov
353/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Valdice	Bez symptómov
354/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Valdice	Bez symptómov
392/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Lužany nad Trotinou	Bez symptómov
560/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Kolín	Bez symptómov
637/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Labětín, Řečnany nad Labem	Žltnutie a mramorovanie listov
638/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Labětín, Řečnany nad Labem	Bez symptómov
639/2016	<i>Ulmus sp.</i>	Labětín, Řečnany nad Labem	Bez symptómov

Tabuľka 1 (pokračovanie): Zoznam testovaných vzoriek

Označenie vzorky/ Rok odberu	Hostiteľ	Lokalita	Príznaky
646/2016	<i>Ulmus</i> sp.	Vrchlabí	Bez symptómov
797/2016	<i>Ulmus</i> sp.	Smržice	Výrazné žltnutie a opadávanie listov
904/2016	<i>Ulmus</i> sp.	Průhonice	Predčasné žltnutie a zvinovanie listov, presychanie vetiev
980/2016	<i>Ulmus glabra</i>	Dyjákovice	Žltnutie listov
671/2015	<i>Cacopsylla ulmi</i>	Vilantice	
771/2016	<i>Cacopsylla ulmi</i>	Vilantice	
773/2016	<i>Cacopsylla ulmi</i>	Vilantice	
774/2016	<i>Psylla alni</i>	Vilantice	
775/2016	<i>Cacopsylla ulmi</i>	Vilantice	
776/2016	<i>Aphrophora alni</i>	Vilantice	

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

Agarose ITM Biotechnology Grade (Ambresco)

Destilovaná voda a sterilná deionizovaná voda

Izopropanol

70% etanol

Reštrikčná endonukleáza: *Mse*I (New England Biolabs, kat. č. R0525S)

*Rsa*I (Promega, kat. č. R6371)

*Bfa*I (New England Biolabs, kat. č. R0568S)

Použité primery (Generi Biotech)

MyTaqTM DNA Polymeráza (Bioline, kat. č. BIO-21107)

Platinum® Taq DNA Polymeráza (Invitrogen, kat. č. 10966-018)

2 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0241)

DNA loading Dye & SDS Solution (6x) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R1151)

GeneRulerTM 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0323)

GoodViewTM Nucleic Acid Stain (SBS Genetech, kat. č. HGV-2)

X-Gal (Fermentas, kat. č. #R0401)

IPTG (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 15529019)

Ampicillin Sodium (Duchefa Biochemie, A0104)

Ethidium bromide solution (Sigma-Aldrich, E1510)

Použité súpravy

BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337457)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28706)

pGEM-T Easy Vector System (Promega, kat. č. A1360)

Použité roztoky a ich príprava

1x TAE pufoľ (príprava zo zásobného roztoku 50x TAE: 242 g Tris base a 37,2 g Na₂EDTA·2H₂O rozpustiť v 900 ml deionizovanej vody, pridať 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej a doplniť H₂O do 1000 ml, pH 8,5)

0,1% roztok bromfenoľovej modrej v 30% glyceríne

SOC médium pre pGEM-T Kit (ku 2 g BactoR-tryptone, 0,5 g BactoR-yeast extract, 1 ml 1M NaCl a 0,25 ml 1M KCl pridať 97 ml destilovanej vody a za miešania rozpustiť, autoklávovať a po schladení na izbovú teplotu pridať 1 ml 2M Mg²⁺ stock a 1 ml 2M glukózy, pH 7)

LB médium (10 g kasein hydrolyzátu, 5 g kvasničného autolyzátu, 5 g peptonu, 10 g NaCl, 1 l H₂O a 17g agaru za miešania rozpustiť (pH 7,2 – 7,4) a autoklávovať 25 – 30 min pri 120 °C)

Zoznam použitých prístrojov a zariadení

Analytické váhy A&D EK 200G (A&D Co. Ltd.)

Autokláv (WITEG Labortechnik)

Centrifúga Biofuge pico (Heraeus)

Centrifúga Spectrafuge 24D (Labnet)

Elektroforetická komôrka HU 10 (Scie-Plas)

Fluorimeter Hoefer DyNa Quant 200 (Amersham Biosciences)

Genetický analyzátor ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems)

Inkubátor (Edmund Bühler GmbH)

Laminárny box PV-100 (Telstar)

Mikrovlnná trúba MA 85050 (OTF)

Minicentrifúga SpectrafugeTM MINI (Labnet)

NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Rotačná trepačka BIO RS-24 (Biosan)

Suchá vodná kúpeľ (Labnet)

Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)

Termocyclér T100TM (BIO-RAD)

UV transluminátor Syngene G:Box - dokumentačný systém GeneSnap (Herolab)

UV transluminátor UVT-14 L (Herolab)

Vortex MS2 Minishaker (IKA)

Zdroj jednosmerného prúdu Power Station 300 (Labnet) a MP-250V (BioTech)

4.3 Identifikácia fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'

DNA izolovaná z potenciálne pozitívnych vzoriek bola testovaná na prítomnosť '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' analýzou génu pre 16S rRNA. Využitá bola štandardná dvojkroková PCR reakcia a následná RFLP analýza produktov. 'Direct' PCR bola prevedená primermi P1 a P7 (Deng *et Hiruki*, 1991; Schneider *et al.*, 1995) a následná 'nested' PCR s primermi R16F2 a R16R2 (Lee *et al.*, 1993; Gundersen *et Lee*, 1996).

Reakčná zmes pre 'direct' PCR obsahovala primery P1 (forward) a P7 (reverse) a bola rozpipetovaná po 18 μ l do 0,2ml mikroskúmaviiek. K zmesi bolo následne pripipetované po 2 μ l DNA a bola prevedená PCR amplifikácia. Reakčná zmes pre 'nested' PCR obsahovala primery R16F2 (forward) a R16R2 (reverse) a bola rozpipetovaná po 23 μ l do 0,2ml mikroskúmaviiek. K zmesi boli následne pripipetované 2 μ l 20x nariedeného PCR produktu z 'direct' PCR a bola prevedená amplifikácia. Zloženie reakčných zmesí a podmienky PCR amplifikácií vid' tabuľka 2 a 3.

Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre 'direct' a 'nested' PCR reakcie

Reakčná zmes	Koncentrácia zásobného roztoku	1 test [μ l] 'direct' PCR	1 test [μ l] 'nested' PCR
Pufor	5x	4,00	5,00
Destilovaná H ₂ O		13,40	17,30
Forward primer	20 μ M	0,20	0,25
Reverse primer	20 μ M	0,20	0,25
MyTaq TM DNA polymeráza (Bioline)	5 U· μ l ⁻¹	0,20	0,20
Celkom		18	23

Tabuľka 3: Podmienky pre 'direct' P1/P7 PCR a 'nested' R16F2/R16R2 PCR reakcie

	Pre-denaturácia	Denaturácia	Nasadanie primerov	Syntéza	Dosyntetizovanie
'Direct' PCR	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	55 °C, 2 min 35 cyklov	72 °C, 3 min	72 °C, 10 min
'Nested' PCR	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	50 °C, 1 min 40 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 10 min

4.3.1 Elektroforetická separácia

Veľkosť PCR produktov bola zistená elektroforetickou separáciou 5 µl PCR produktu v 1% agarózovom géle v 1x TAE pufri za prítomnosti farbiva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, E. coli). Produkty boli separované po dobu 60 min pri 80 V a následne vizualizované pomocou dokumentačného systému G:Box (Syngene).

4.3.2 RFLP analýza

Pre identifikáciu detekovanej fytoplazmy a potvrdenie prítomnosti ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ boli pri RFLP analýze použité tri reštrikčné enzýmy a to *MseI* (New England Biolabs), *RsaI* (Promega) a *BfaI* (New England Biolabs). Získané R16F2/R16R2 produkty boli pred štiepaním prečistené s využitím kitu QIA quick Gel Extraction Kit (podľa QIA quick Spin Handbook 07/2002; Qiagen, Germany). Ako kontrola RFLP reakcie boli použité profily fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ (pôvodca európskej žltacky kôstkovíc).

4.4 Genotypizácia izolátov fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’

Pre multigénovú charakteristiku fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ boli analyzované: parciálna sekvencia génu pre 16S rRNA, oblasť kódujúca ribozomálne proteíny rpl22 a rps3, parciálna sekvencia secY génu (kódujúca proteín SecY, ktorý tvorí podjednotku proteínu translokázy), secY-map lokus, tuF gén (kódujúci elongačný faktor Tu) a parciálna sekvencia secA génu (kódujúca proteín SecA, ktorý je súčasťou podjednotky translokázy). Časti spomenutých génov boli amplifikované s odpovedajúcimi primermi a prítomnosť očakávaných produktov bola potvrdená elektroforetickou separáciou v 1% agarózovom géle a ich následnou vizualizáciou.

Gén pre 16S rRNA bol u izolátov z roku 2015 amplifikovaný v dvojkrokovej PCR, ‘direct’ PCR za pomoci primerov P1/P7 (Deng *et Hiruki*, 1991; Schneider *et al.*, 1995), nasledovanej jednou z dvoch variant nadväzujúcej PCR a to: (a) ‘seminested’ s využitím páru primerov P1A/P7 (Deng *et Hiruki*, 1991; Lee *et al.*, 2004b) alebo (b) ‘nested’ s primermi F1/B6 (Davis *et Lee*, 1993; Padovan *et al.*, 1995). U izolátov z roku 2016 bol použitý amplikón R16F2/R2, vid’ predchádzajúci postup. Podmienky PCR reakcií zhrnuté v tabuľke 5.

Oblasť kódujúca ribozomálne proteíny rpl22 a rps3 bola amplifikovaná v dvojkrokovej PCR podľa Lee *et al.* (2004b), ‘direct’ PCR bola prevedená za pomoci primerov rp(V)F1/rp(V)R1, nasledovanej ‘nested’ PCR prevedenej za pomoci primerov

rp(V)F1A/rp(V)R1A. Reakčná zmes pre obe PCR bola pripravovaná s Platinum Taq DNA polymerázou (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen), zloženie vid' tabuľka 4. Podmienky PCR reakcií zhrnuté v tabuľke 5.

Tabuľka 4: Zloženie reakčnej zmesi pre 'nested' PCR s primermi rp(V)F1A a rp(V)R1A

Reakčná zmes	Koncentrácia zásobného roztoku	1 test [μ l]
Pufor	10x	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5
Destilovaná H ₂ O		15,8
dNTP	2 mM	2,5
f primer (rp(V)F1A)	20 μ M	0,25
r primer (rp(V)R1A)	20 μ M	0,25
Platinum Taq DNA polymeráza	5 U· μ l ⁻¹	0,2
Celkom		23

Časť sekvencie kódujúcej *secY* bola amplifikovaná v dvojkrokovej PCR podľa Angelini *et al.* (2001), 'direct' PCR reakcia bola prevedená za pomoci primerov FD9f/FD9r (Daire *et al.*, 1997), nasledovanej 'nested' PCR prevedenej za pomoci primerov FD9f3/FD9r2 (Angelini *et al.*, 2001). Zloženie reakčnej zmesi pre obe PCR bolo rovnaké ako v prípade amplifikácie ribozomálnych proteínov, vid' tabuľka 4. Podmienky PCR reakcií vid' tabuľka 5.

Oblasť kódujúca *secY-map* bola amplifikovaná za pomoci primerov FD9f5/MapR1 (Arnaud *et al.*, 2007). Zloženie reakčnej zmesi bolo rovnaké ako v prípade amplifikácie génu pre ribozomálne proteíny, vid' vyššie. V prípade slabých produktov poprípade izolátov bez produktov bola prevedená 'nested' PCR s rovnakými primermi a 20x nariedenými produktmi z prvej PCR. Podmienky PCR reakcie vid' tabuľka 5.

Oblasť kódujúca elongačný faktor Tu bola amplifikovaná v dvojkrokovej PCR podľa Malembic-Maher *et al.* (2011), 'direct' PCR za pomoci primerov FDTUF-F1/FDTUF-R1, 'seminested' PCR za pomoci primerov FDTUF-F1/FDTUF-R2. Podmienky PCR reakcií zhrnuté v tabuľke 5.

Oblasť kódujúca *secA* bola amplifikovaná dvoma spôsobmi. Najprv bola prevedená dvojkrovová PCR, 'direct' PCR za pomoci primerov SecAfor1/SecArev3, 'seminested' PCR za pomoci primerov SecAfor2/SecArev3 (Dickinson *et al.* Hodgetts, 2013). V druhom prípade boli 20x nariedené produkty 'direct' PCR využité pre následnú 'nested' PCR s primermi SecA-Vf/SecA-Vr (navrhnutých v tejto práci, 5'- ACTTCAGTTATGTCTGCWTATTT - 3'/ 5' - TCGATGCTACAACCTTCTTT - 3'). Podmienky PCR reakcií zhrnuté v tabuľke 5.

Tabuľka 5: Podmienky PCR reakcií pre jednotlivé primery

Primery	Počiatočná denaturácia	Denaturácia	Nasadenie primerov	Syntéza	Dosyntetizovanie reťazcov
P1A/P7	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	55 °C, 1 min 40 cyklov	72 °C, 3 min	72 °C, 7 min
F1/B6	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	50 °C, 2 min 35 cyklov	72 °C, 3 min	72 °C, 10 min
R16F2/R2	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	50 °C, 1 min 40 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 10 min
rp(V)F1/R1	94 °C, 3 min	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min 35 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 10 min
rp(V)F1A/R1A	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min	50 °C, 2 min 40 cyklov	72 °C, 3 min	72 °C, 7 min
FD9f/r	95 °C, 3 min	95 °C, 30 s	54 °C, 30 s 40 cyklov	72 °C, 2 min	72 °C, 7 min
FD9f3/r2	95 °C, 90 s	92 °C, 30 s	48 °C, 30 s 40 cyklov	72 °C, 75 s	72 °C, 7 min
FD9f5/MapR1	95 °C, 1 min	92 °C, 30 s	52 °C, 30 s 35 cyklov	72 °C, 90 s	72 °C, 10 min
FDTUF-F1/R1	95 °C, 1 min	92 °C, 30 s	56 °C, 30 s 40 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 5 min
FDTUF-F1/R2	95 °C, 1 min	92 °C, 30 s	56 °C, 30 s 40 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 5 min
M13f/M13r	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	55 °C, 1 min 40 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 5 min
SecAfor1/rev3	94 °C, 2 min	94 °C, 1 min	52 °C, 45 s 35 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min
SecAfor2/rev3	94 °C, 2 min	94 °C, 1 min	52 °C, 45 s 35 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min
SecA-Vf/ r	94 °C, 2 min	94 °C, 1 min	52 °C, 45 s 35 cyklov	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min

4.5 Sangerove sekvenovanie PCR produktov

Špecifické PCR produkty boli izolované pomocou QIA quick Gel Extraction Kit, podľa pokynov výrobcu. DNA bola vo finálnom kroku eluovaná do 30 µl deionizovanej vody a následne bola jej koncentrácia stanovená fluorometricky pomocou fluorometru Hofer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences). FD9f3/r2 PCR produkty boli z dôvodu nešpecifického nasadenia ‘forward‘ primeru zaklonované do pGEM-T vektoru a následne boli pre každú vzorku sekvenované tri kolónie pomocou primerov M13f a M13r. Tento postup bol využitý aj pri získaní sekvencií pre iné gény, a to u izolátov, u ktorých nebola získaná sekvencia priamym sekvenovaním. U troch izolátov bola kompletná sekvencia pre oblasť kódujúcu *secY* získaná zložením sekvencie produktu FD9f3/r2 sekvenovaného pomocou

dvoch reverzných primerov: FD9r2 (Angelini *et al.*, 2001) a FD9r-seq (navrhnutom v tejto práci, 5' - GTTATTAAATCAGCTAACCAAACAG - 3'). Izolovaná DNA bola značená pomocou BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kitu podľa pokynov výrobcu. Zoznam primerov použitých pri sekvenčnom značení jednotlivých genomických fragmentov vid' tabuľka 6. Produkty boli následne sekvenované pomocou genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na Ústave experimentálnej botaniky, AV ČR, CR Haná, Olomouc.

Tabuľka 6: Rozpis primerov použitých pre sekvenovanie jednotlivých PCR fragmentov

PCR produkty	Dĺžka produktu [bp]	Použité primery
P1A/P7	1827	P1A, P7, fU5, M1, R2
F1/B6	1714	F1, B6, M1, R2
R16F2/R2	1203	F2, R2
rp(V)F1A/R1A	1155	rp(V)F1A, rp(V)R1A
FD9f/FD9r	1300	FD9f, FD9r
FD9f3/FD9r2	1150	FD9f3, FD9r2
FD9f5/MapR1	875	FD9f5, MapR1
FDTUF-F1/FDTUF-R2	998	FDTUF-F1, FDTUF-R2
SecAfor1/SecArev3	840	SecAfor1, SecArev3
SecAfor2/SecArev3	480	SecAfor2, SecArev3
SecA-Vf/SecA-Vr	716	SecA-Vf, SecA-Vr

4.6 Bioinformatická analýza

Primárne sekvenčné výstupy boli zložené do výsledných kontigov pomocou programu SeqMan (DNASTAR, Lasergene). Identita získaných sekvencií bola potvrdená porovnaním so sekvenciami dostupnými v GenBank databáze s využitím programu BLASTN (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Jednotlivé získané sekvencie boli porovnané s príslušnými sekvenciami dostupnými v databáze GenBank pomocou ClustalW algoritmu. Fylogenetické vzťahy boli vyhodnotené pomocou Neighbor-Joining analýzy s použitím Tamura-3 parametric modelu a 500 opakovaní (bootstrapping), výsledné stromy boli vizualizované v programe Tree Explorer (všetky analýzy boli prevedené pomocou software Mega, verzia 6.0) a na ich základe bola posúdená variabilita a evolučná príbuznosť analyzovaných izolátov fytoplazmy žltacky brestu.

5 Výsledky

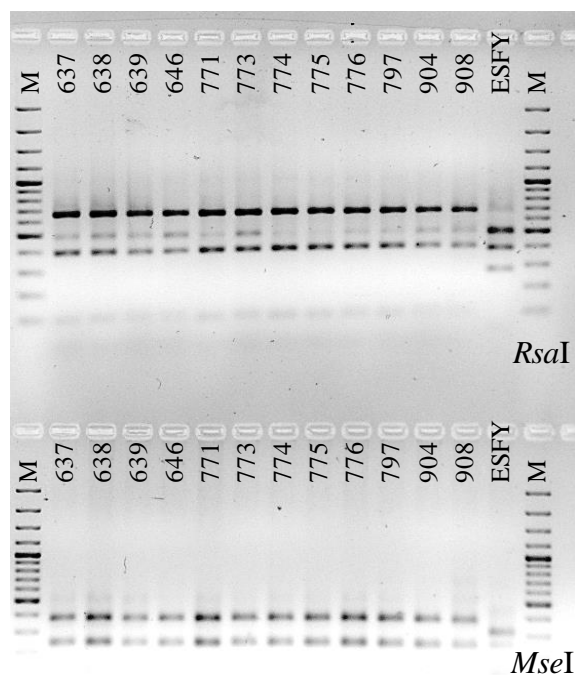
Pre štúdium genetickej variability fytoplazmy žltáčky brestov ('*Candidatus Phytoplasma ulmi*') bolo vybraných 32 vzoriek, ktoré boli získané pracovníkmi Laboratória virológie (Oddelenie diagnostické laboratórium Olomouc, ÚKZÚZ) v rokoch 2015 (13 vzoriek) a 2016 (19 vzoriek) v priebehu prieskumu výskytu ochorenia žltáčky brestov v Českej republike. Vzorky pochádzali z 12 lokalít v ČR.

Dvadsaťšesť analyzovaných DNA bolo izolovaných z rastlín brestu (*Ulmus* sp.), desať z nich pochádzalo z brestu poľného (*U. minor* Mill.), v jednom prípade z brestu horského (*U. glabra* Huds.). U jednotlivých stromov boli pozorované príznaky o rôznej intenzite, uvedené v tabuľke 1 (kapitola materiál a metódy), pričom typické prejavy infekcie ako žltnutie listov, ich opadanie poprípade chloróza boli pozorované u piatich stromov. U jedného stromu boli pozorované príznaky typické pre listovú škvrnitosť brestu (*Stegophora ulmea*), ale toto ochorenie spôsobené hubou *Mycosphaerella ulmi* Kleb. nebolo potvrdené (Linhartová, ústne oznámenie). U 18 stromov neboli pozorované žiadne príznaky infekcie.

Zvyšných šesť analyzovaných DNA pochádzalo z infikovaných zástupcov hmyzu z radu polokrídlavcov (*Hemiptera*), ktorí boli odchytení na lokalite Vilantice, v štyroch prípadoch sa jednalo o méru *Cacopsylla ulmi*, v jednom prípade o méru *Psylla alni* a v jednom prípade o peniarku *Aphrophora alni*.

5.1 Identifikácia fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'

S využitím R16F2/R2-PCR bola u izolátov amplifikovaná oblasť kódujúca 16S rRNA a následne RFLP analýzou s pomocou troch reštrikčných endonukleáz overovaná prítomnosť '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Pri štiepaní *MseI* a *RsaI* boli u 30 izolátov získané profily typické pre skupinu 16SrV (Obr. 2) u dvoch izolátov (517 a 354) boli získané zmesné profily, ktoré nebolo možné jednoznačne vyhodnotiť. Pri štiepaní *BfaI* boli získané 2 profily; prvý typický pre podskupinu 16SrV-A bol získaný u 19 vzoriek, 16 získaných z brestov a tri získané z méru *Cacopsylla ulmi*, všetky vzorky pritom pochádzali zo stredných a východných Čiech; a druhý typický pre podskupiny 16SrV-C a 16SrV-D bol identifikovaný u 11 vzoriek, ôsmich získaných z brestov z Čiech aj Moravy a troch druhov hmyzích zástupcov z lokality Vilantice, východné Čechy. U tých istých dvoch izolátov ako pri predchádzajúcom štiepaní (izolát 517 a 354) opäť neboli získané hodnotiteľné RFLP profily.



Obrázok 2: *RsaI*-RFLP a *MseI*-RFLP profily R16F2/R16R2 produktov vybraných izolátov fytoplazmy žltacky brestu.

Legenda: M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), 637 – 908: označenia izolátov, ESFY: fytoplazma európskej žltacky kôstkovín

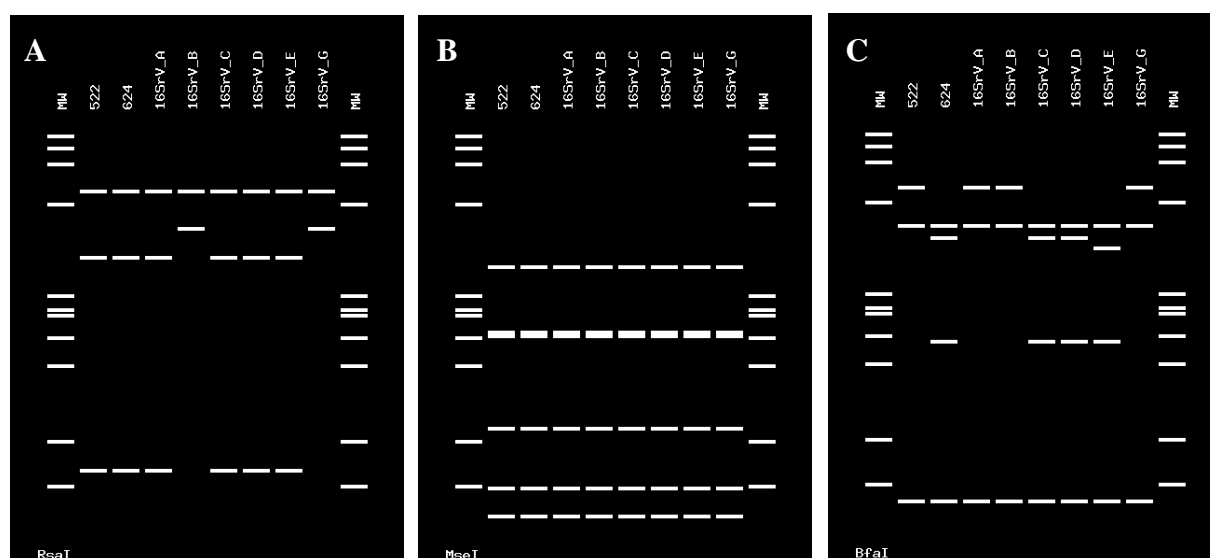
5.2 16S rRNA gén

Amplifikáciou DNA pomocou PCR reakcie boli získané produkty pre oblasť kódujúcu 16S rRNA u 32 izolátov. Následným Sangerovým sekvenovaním boli u ôsmich z nich získané sekvencie P1A/P7 fragmentu o dĺžke 1689 – 1728 bp, u ôsmich izolátov boli získané sekvencie F1/B6 produktov o dĺžke 1175 – 1583 bp a u dvanástich izolátov sekvencie R16F2/R2 produktov o dĺžke 1163 – 1168 bp. U dvoch izolátov bola získaná len čiastočná sekvencia P1A/P7 produktu, pre izolát 516 o dĺžke 1355 bp a pre izolát 628 o dĺžke 1399 bp. S výnimkou izolátu 774 pôvodom z méry *Psylla alni* vykazovali sekvencie minimálnu odlišnosť, ich nukleotidová identita stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 99,79 – 100 %. BLASTN analýzou sekvencií bola u 29 izolátov potvrdená ich identita ako ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, pričom sekvenčná identita izolátov s referenčným izolátom EY1 (Acc. No. AY197655) dosahovala hodnotu 99 % (bez ohľadu na ich dĺžku). Sekvencie boli priradené pomocou programu ClustalW a s ohľadom na vybraný referenčný izolát ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ EY1 a jeho nukleotidovú sekvenciu (AY197655), v nich boli identifikované tri jednonukleotidové zámény. U desiatich izolátov, osem získaných z brestov zo šiestich rôznych lokalít Čiech aj Moravy a dvoch druhoch hmyzu

Cacopsylla ulmi a *Aphrophora alni* z jednej lokality východných Čiech, bola identifikovaná zámena T/C v pozícii 1100 vzhľadom k referenčnej sekvencii, v typovom ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ motíve lokalizovanom do pozície 1098 – 1108, tabuľka 7. Táto zámena vedie v sekvencii k vzniku nového štiepneho miesta rozoznávateľného reštrikčnou endonukleázou *BfaI*. Tieto izoláty potom nevykazujú RFLP profil typický pre 16SrV-A podskupinu a namiesto toho vykazujú profil typický pre podskupiny 16SrV-C/D (Obr. 3).

Tabuľka 7: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltacky brestu v unikátnom sekvenčnom motíve 16S rRNA génu charakteristickom pre druh ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ (AY197655) v oblasti 1098 – 1108; tučné písmo – typová sekvencia referenčného izolátu, žltá farba – variabilné miesta

Izolát	Hostiteľ	typová sekvencia (‘5 – 3’)
oblasť v pozícii 1098 – 1108		
EY1 (AY197655)	<i>Ulmus americana</i>	CGTTAGTTGCC
627	<i>Ulmus minor</i>	CGTTAGTTGCC
629	<i>Ulmus minor</i>	CGTTAGTTGCC
521	<i>Ulmus minor</i>	CGTTAGTTGCC
522	<i>Ulmus minor</i>	CGTTAGTTGCC
646	<i>Ulmus</i> sp.	CGCTAGTTGCC
797	<i>Ulmus</i> sp.	CGCTAGTTGCC
516	<i>Ulmus</i> sp.	CGCTAGTTGCC
628	<i>Ulmus minor</i>	CGCTAGTTGCC



Obrázok 3: *In silico* RFLP profily vybraných typových izolátov ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ štiepaných reštrikčnými endonukleázami *RsaI* (A), *MseI* (B) a *BfaI* (C).

Legenda: 16SrV A-G predstavujú typové profily izolátov podskupín 16SrV A-G, MW: štandard molekulevej hmotnosti (α X174 DNA štiepaný *HaeIII*), 522 a 624: vybrané izoláty, iPhyClassifier

U izolátu '*Ca. Phytoplasma ulmi*' získaného z brestu, lokalita Průhonice (izolát 904), bola v pozícii 988 identifikovaná ešte jedna špecifická záměna A/G a u všetkých českých izolátov bola v pozícii 486 s ohľadom na referenčnú sekvenciu zaznamenaná záměna A/C.

Fylogenetická analýza týchto sekvencií pomocou Neighbor-Joining metódy viedla k ich rozdeleniu do dvoch homogénnych vetiev, pričom spomínaná variabilita izolátov v typovej sekvencii bola zhodná s vetvením fylogenetického stromu.

Pri analýze tejto génovej oblasti nebola u izolátu 774 získaného z méry *Psylla alni* preukázaná prítomnosť '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', získaná sekvencia vykazovala 99% identitu s Alder yellows phytoplasma, s izolátom SW58 (KP238298). Pre vzorku 517 získanú z brestu, lokalita Vrbka u Opavy, boli sekvenovaním získané iba čiastočné fragmenty sekvencie P1A/P7 produktu, ktoré vykazovali najväčšiu identitu (98 %) s nekultivovateľnými baktériami vrátane rodu *Propionibacterium* (napr. KP967484, GQ091640). Táto vzorka bola vyradená z ďalších analýz. U jednej vzorky brestu z Valdíc (izolát 354) sa nepodarilo získať sekvenciu 16S rRNA génu fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. PCR sekvencie u tejto vzorky vykazovali najvyššiu sekvenčnú identitu (98 %) s nekultivovateľnými baktériami (napr. KC554412, AM697010), čo bolo s prihliadnutím na pozorovaný zmesný RFLP profil očakávané, sekvenčná analýza tak potvrdila zmesnú infekciu tohto hostiteľa viacerými patogénmi.

5.3 SecY-map lokus

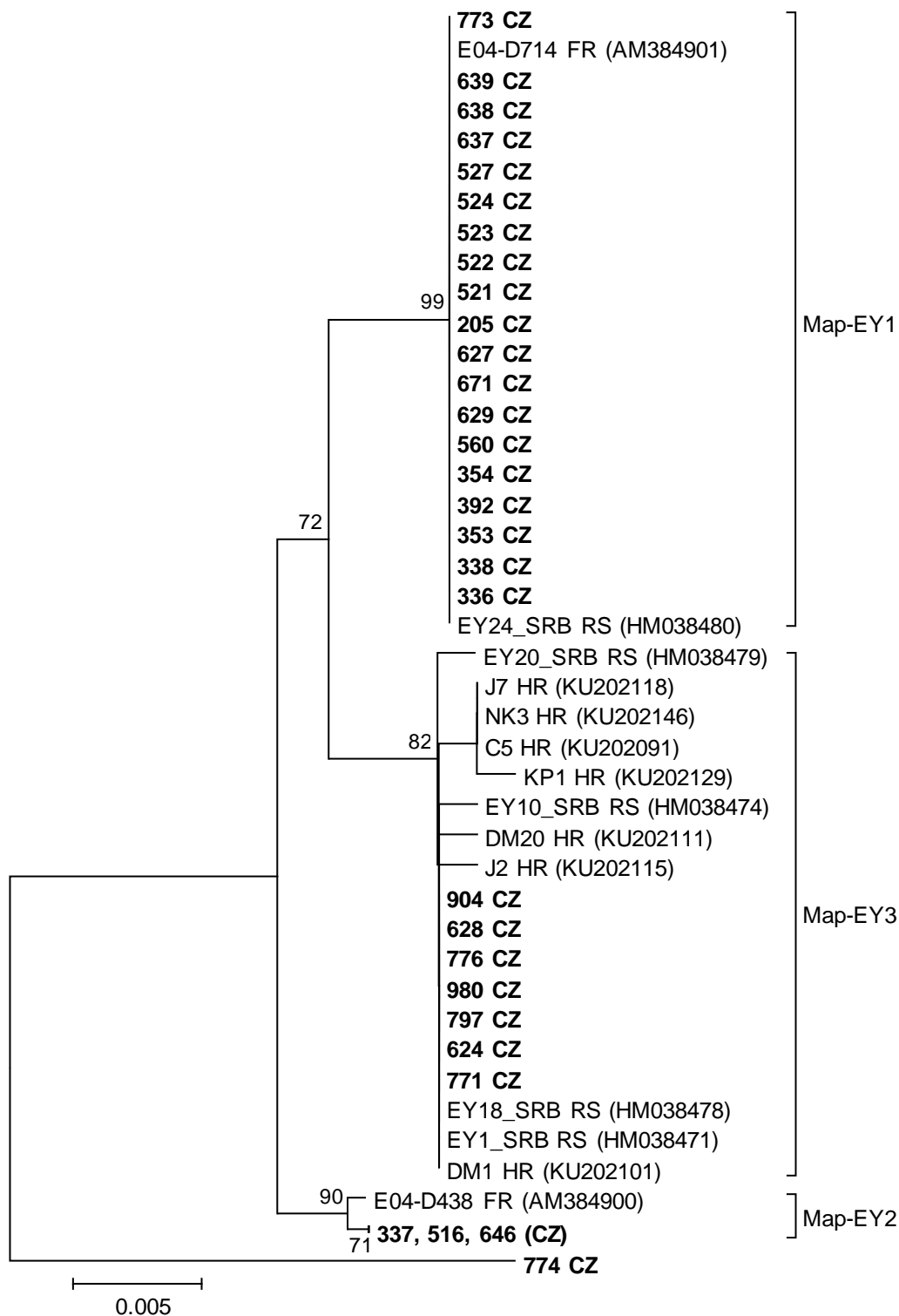
'Direct' PCR boli u 31 izolátov získané produkty lokusu secY-map a následným Sangerovým sekvenovaním boli pre všetky FD9f5/MapR1 fragmenty získané ich sekvencie o dĺžke 805 – 873 bp. Získané sekvencie vykazovali vyššiu variabilitu než sekvencie pre 16S rRNA, ich sekvenčná identita (s výnimkou izolátu 774 pôvodom z méry *Psylla alni*) stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 98,72 – 100 %. BLASTN analýza sekvencií potvrdila u 30 izolátov z 31 ich identitu ako '*Candidatus Phytoplasma ulmi*', pričom nukleotidové sekvencie vykazovali 99 – 100% identitu s vybraným izolátom NK7 (KU202148) a odvodené aminokyselinové sekvencie map (metionín aminopeptidáza) proteínu o dĺžke 225 – 235 aminokyselín (AMK) vykazovali v BLASTP analýze 99 – 100% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu DM1 (ALQ78347).

V nukleotidových sekvenciách pre lokus secY-map priradených pomocou programu ClustalW bolo, s ohľadom na vybraný izolát '*Ca. Phytoplasma ulmi*' EY24_SRB a jeho nukleotidovú (HM038480) a aminokyselinovú (ADO33717) sekvenciu, identifikovaných pätnásť variabilných miest. U desiatich izolátov (patriacich do jednej skupiny aj pri analýze

16S rRNA), osem získaných z brestov zo šiestich rôznych lokalít Čiech aj Moravy a dvoch druhov hmyzu *Cacopsylla ulmi* a *Aphrophora alni* z jednej lokality východných Čiech, bolo v oblasti kódujúcej map proteín identifikovaných päť spoločných variabilných miest, pričom dve z týchto zámien v pozícii 166 - T/G a 584 - T/C boli nesynonymné a viedli v sekvencii map proteínu v pozícii 24 k zámene K/N a v pozícii 164 k zámene H/Y. Sedem z týchto izolátov (vynímajúc tri izoláty 516, 337 a 646 z východných Čiech) malo dva spoločné SNP navyše a to v pozícii 343 - C/T a 625 - T/C. Pre vzorku 'Ca. Phytoplasma ulmi' získanú z méry *Cacopsylla ulmi* (označenie 775) boli identifikované dva sekvenčné motívy v jednej sekvencii, čím bola preukázaná prítomnosť dvoch odlišných izolátov, ktoré sa líšili práve v siedmich vyššie spomínaných SNP. U zvyšných troch izolátov z tejto skupiny získaných z brestov z rôznych lokalít východných Čiech (izoláty 337, 516 a 646), bolo identifikovaných ďalších osem spoločných variabilných miest, pričom zámena v pozícii 467-A/G bola nesynonymná a v pozícii 125 map proteínu viedla k zámene aminokyselín E/K .

U vzorky 774 pôvodom z méry *Psylla alni* bola získaná sekvencia secY-map lokusu o dĺžke 873 bp a BLASTN analýzou bola preukázaná jej 99% identita s odpovedajúcou sekvenciou secY-map lokusu pre Alder yellows phytoplasma izolátu A06-30-20 (FN561863). Zároveň boli u tejto vzorky identifikované dva sekvenčné motívy v jednej sekvencii, čím bola preukázaná zmesná infekcia vzorky dvoma izolátmi fytoplazmy Alder yellows phytoplasma.

Získané sekvencie boli porovnané s dostupnými sekvenciami izolátov v databáze GenBank. Po priradení všetkých sekvencií pomocou algoritmu ClustalW a ich následnou fylogenetickou analýzou pomocou Neighbor-Joining metódy došlo k rozdeleniu charakterizovaných izolátov 'Ca. Phytoplasma ulmi' do troch základných línii (Obr. 4). Prvú skupinu tvorilo celkovo 17 izolátov získaných z brestov a dva izoláty získané z méry *Cacopsylla ulmi*, všetky z oblasti stredných a východných Čiech, ktoré sa vyvetvili spoločne s izolátom E04-D714 pôvodom z Francúzska a izolátom EY24_SRB pôvodom zo Srbska, patriacich do línie Map-EY1. Druhú skupinu tvorilo päť izolátov pôvodom z brestov zo štyroch rôznych, geograficky vzdialených lokalít (Průhonice, Dyjákovice, Smržice, Velký Vřešťov) a z dvoch rôznych druhov hmyzu z lokality Vilantice. Tieto izoláty tvorili spoločný klaster so štyrmi izolátmi zo Srbska a siedmimi izolátmi z Chorvátska, línia Map-EY3, pričom všetky izoláty tejto skupiny boli najbližšie príbuzné DM1 izolátu s genotypom EY-map-5. Izoláty tretej skupiny pôvodom z brestov z rôznych lokalít východných Čiech sa začlenili do línie Map-EY2 spolu s izolátom E04-D438 z Francúzska, ale v rámci tejto línie vytvorili samostatnú vetvu. Vnútri všetkých troch skupín bola medzi jednotlivými študovanými izolátmi minimálna variabilita.



Obrázok 4: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií *secY*-map lokusu

Legenda: Fylogenetický strom vytvorený Neighbor-Joining analýzou nukleotidových sekvencií *secY*-map lokusu. Označenie izolátov: názov/kód krajiny pôvodu/GenBank accession number; úsečka znázorňuje 0,5 percentuálnu sekvenčnú divergenciu; zobrazená bootstrap hodnota ≥ 70 % získaná pri 500 opakovaní; izoláty testované v tejto práci vyznačené tučným písmom. Ako outgroup použitá sekvencia lokusu *secY*-map pre Alder yellows phytoplasma izolátu 774.

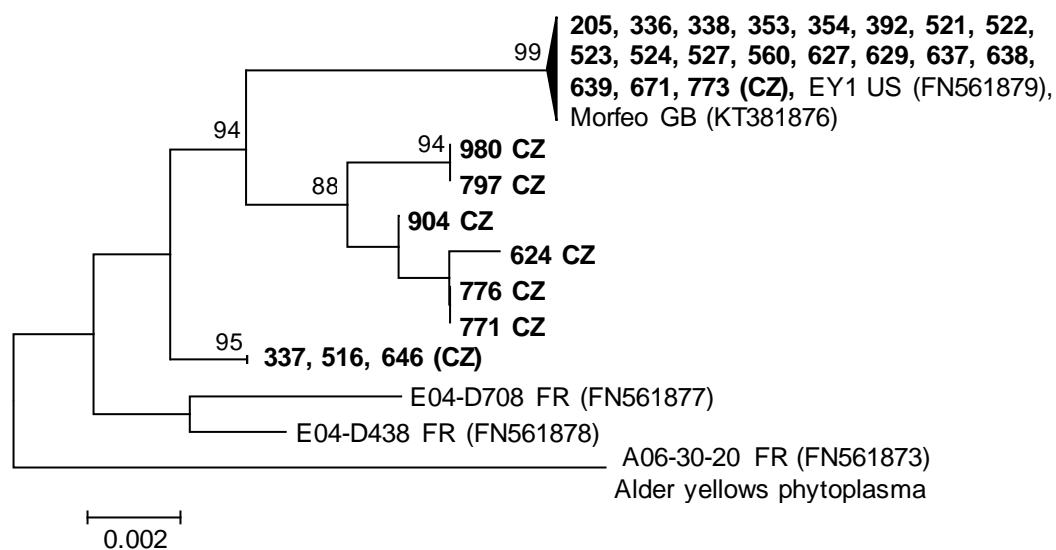
5.4 Tuf gén

Dvojkrokovou PCR boli u 30 izolátov získané EYTUF-F1/R2 amplicóny a následným Sangerovým sekvenovaním boli pre všetky tieto izoláty získané sekvencie EYTUF-F1/R2 fragmentu o dĺžke 929 – 982 bp. Získané sekvencie vykazovali obdobnú variabilitu ako sekvencie *secY-map*, ich nukleotidová identita (s výnimkou izolátu 774 pôvodom z méry *Psylla alni*) stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 98,69 – 100 %. BLASTN analýzou sekvencií bola u 29 izolátov z 30 potvrdená ich identita ako ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, pričom nukleotidové sekvencie vykazovali 98 – 100% identitu s izolátom EY1 (FN561879) a odvodené aminokyselinové sekvencie tuf proteínu (elongačný faktor Tu) o dĺžke 308 – 325 AMK vykazovali v BLASTP analýze 99 – 100% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu EY1 (CBH29524).

V nukleotidových sekvenciách priradených pomocou programu ClustalW bolo, s ohľadom na vybraný izolát ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ EY1 a jeho nukleotidovú (FN561879) a aminokyselinovú (CBH29524) sekvenciu, identifikovaných sedemnást’ variabilných miest. U deviatich izolátov, (ktoré patrili do jednej samostatnej skupiny pri analýze sekvencií pre 16S rRNA) bolo identifikovaných šesť spoločných variabilných miest, pričom tri z týchto zámen v pozíciách 376 - A/G, 429 - T/A a 757 - T/G boli nesynonymné a viedli v sekvencii tuf proteínu v pozícii 120 k zámene K/E, 137 - D/E a 247 - L/V. Variabilita bola však pozorovaná aj vnútri tejto vyčlenenej skupiny a predstavovala ďalších deväť SNP spoločných pre rôzne izoláty z tejto skupiny. Dve z týchto zámen v pozícii 315 - T/A (izoláty 624, 771, 776, 904, 980, 797) a 466 - G/A (izoláty 337, 516, 646) boli nesynonymné a viedli v sekvencii tuf proteínu v pozícii 105 k zámene D/E a v pozícii 156 k zámene V/I. Jedinečné SNP boli objavené aj pre jednotlivé izoláty z východných Čiech a to v prípade izolátu 629 pôvodom z brestu, kde bola v pozícii 777 detekovaná jedinečná zámena T/C a pre izolát 624 takisto pôvodom z brestu, kde bola v pozícii 924 detekovaná zámena C/A. U vzorky s označením 755 pôvodom z méry *Cacopsylla ulmi* boli identifikované dva sekvenčné motívy v jednej sekvencii a bola tak preukázaná prítomnosť dvoch odlišných izolátov, ktoré sa líšili vo variabilných miestach spoločných pre izoláty 624, 771 a 776.

U vzorky 774 pôvodom z méry *Psylla alni* bola získaná sekvencia EYTUF-F1/R2 fragmentu o dĺžke 946 bp a BLASTN analýzou bola preukázaná jej 99% identita s odpovedajúcou sekvenciou tuf génu pre Alder yellows phytoplasma izolátu A06-30-27 (FN561874). U tejto vzorky bola analýzou zároveň preukázaná zmesná infekcia dvoma izolátmi fytoplazmy Alder yellows phytoplasma líšiacich sa v troch variabilných miestach.

Následnou fylogenetickou analýzou nukleotidových sekvenci českých izolátov a sekvenci dostupných v databáze GenBank pomocou Neighbor-Joining metódy došlo k rozdeleniu izolátov '*Ca. Phytoplasma ulmi*' z Českej republiky do troch základných skupín (Obr. 5). Prvú skupinu tvorilo 19 izolátov pôvodom z brestov aj mér *Cacopsylla ulmi* zo stredných a východných Čiech, ktoré sa vyvetvili spoločne s izolátom EY1 z USA a Morfeo izolátom z Veľkej Británie a vytvorili samostatnú vetvu rovnako ako pri analýze 16Sr RNA. Druhú skupinu tvorilo šesť izolátov pôvodom z dvoch rôznych hmyzích jedincov a štyroch brestov zo stredných a východných Čiech ako aj Moravy, ktoré sa vetvili do ďalších podskupín čo odpovedalo popísanej variabilite na úrovni nukleotidových sekvencií. Tretiu skupinu tvorili tri izoláty pôvodom z brestov z východných Čiech. Dva izoláty E04-D708 a E04-D438 z Francúzska sa vyvetvili do samostatnej vetvy avšak podpora tejto vetvy bola nízka. Variabilita v rámci samostatných skupín bola výrazná u druhej skupiny, v ostatných skupinách bola variabilita medzi izolátmi minimálna.



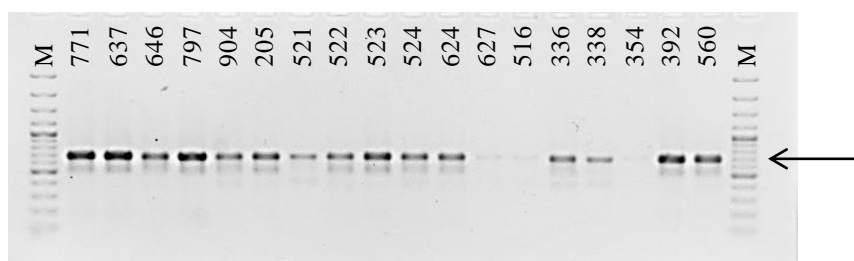
Obrázok 5: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií tuf génu

Legenda: Fylogenetický strom vytvorený Neighbor-Joining analýzou nukleotidových sekvencií oblasti kódujúcej tuf gén. Označenie izolátov: názov/kód krajiny pôvodu/GenBank accession number; úsečka znázorňuje 0,2 percentuálnu sekvenčnú divergenciu; zobrazená bootstrap hodnota ≥ 70 % získaná pri 500 opakovaníach; izoláty testované v tejto práci vyznačené tučným písmom. Ako outgroup použitá sekvencia tuf génu pre Alder yellows phytoplasma izolátu A06-30-20 (FN561873).

5.5 SecA gén

Dvojkrokovou PCR amplifikáciou za využitia univerzálnych primerov boli u troch izolátov získané SecAfor2/SecArev3 produkty a následným sekvenovaním boli získané ich sekvencie o dĺžke 460 – 535 bp. BLASTN analýza potvrdila 99% identitu so sekvenciou *secA* pre New York elm yellows phytoplasma izolátu EY_NY (KJ462035) iba u jedného izolátu 639 pôvodom z brestu. V dvoch prípadoch (izolát 776 pôvodom z peniarky *Aphrophora alni* a izolát 560 pôvodom z brestu) boli získané nešpecifické produkty, ktoré vykazovali podobnosť so *secA* sekvenciami proteobaktérií. S ohľadom na preukázanú nešpecifickosť amplifikácie pri ‘nested’ PCR bolo analyzovaných desať produktov získaných pri ‘direct’ PCR. Pri sekvenovaní ‘direct’ produktov boli získané sekvencie ich SecAfor1/SecArev3 fragmentov o dĺžke 795 – 820 bp. BLASTN analýza sekvencií potvrdila u piatich izolátov 99% identitu s odpovedajúcou sekvenciou *secA* u izolátu EY_NY (KJ462035), u zvyšných piatich izolátov boli získané nešpecifické produkty, pričom BLASTN analýza preukázala ich 99% identitu so *secA* sekvenciou pre endosymbionta *Wolbachia* (napr. AM999887).

Z dôvodu zistenej nespoľahlivosti PCR amplifikácie génu *secA* boli navrhnuté nové primery SecA-Vf/SecA-Vr pre ‘nested’ PCR, s ktorých pomocou boli získané očakávané produkty o veľkosti ~ 700 bp u 27 izolátov (Obr. 6) a následne boli sekvenovaním získané ich sekvencie o dĺžke 600 – 696 bp. Sekvencie vykazovali minimálnu odlišnosť, ich nukleotidová identita (s výnimkou izolátu 774 pôvodom z méry *Psylla alni*) stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 99,69 – 100 %. BLASTN analýzou bola u 26 izolátov potvrdená ich identita ako ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’, pričom nukleotidové sekvencie vykazovali 99% identitu s izolátom EY_NY (KJ462035) a odvodené aminokyselinové sekvencie SecA proteínu o dĺžke 200 – 231 AMK vykazovali v BLASTP analýze 100% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu EY_NY (AJS09597).



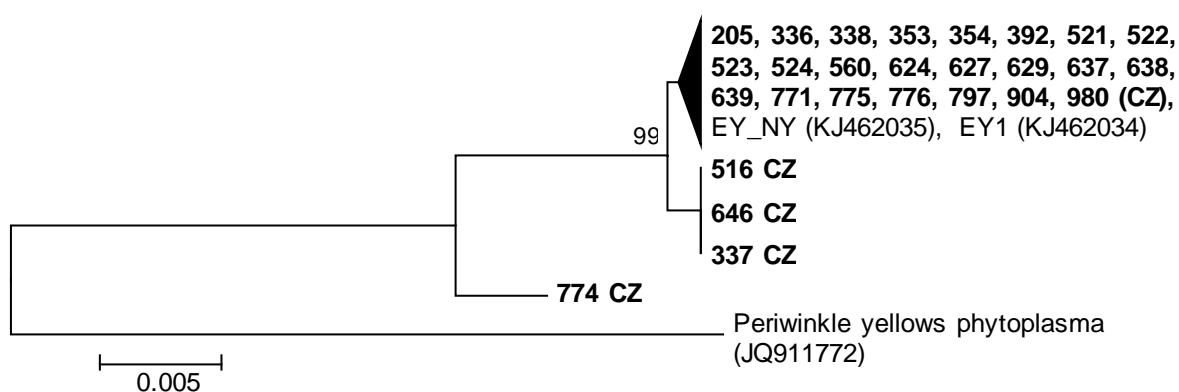
Obrázok 6: Detekcia SecA-Vf/r produktov vybraných izolátov pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle

Legenda: M: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), 771 – 560: označenia izolátov, šípka: vyznačenie pozície špecifického produktu v géle

Nukleotidové sekvencie boli priradené pomocou programu ClustalW a v nich, s ohľadom na vybraný izolát ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ EY_NY a jeho nukleotidovú sekvenciu (KJ462035), boli identifikované celkovo štyri SNP. U všetkých troch izolátov (patriacich do Map-EY2 línie) bol identifikovaný jeden spoločný SNP v pozícii 183 - C/T. Zvyšné tri SNP boli špecifické pre tri konkrétne izoláty (izoláty 797, 980 a 524), ich význam v rámci fylogénézy bol však minoritný. Všetky zámény boli pritom synonymné a nevedli k zamenám aminokyselín v SecA proteíne.

U vzorky 774 pôvodom z méry *Psylla alni* bola získaná sekvencia SecA-Vf/SecA-Vr fragmentu o dĺžke 688 bp a BLASTN analýzou bola preukázaná jej 99% identita s odpovedajúcou sekvenciou *secA* u *Flavescence doreé* phytoplasma, izolát FD-C (KJ462039). Pri analýze tohto génu bola zároveň u méry *Psylla alni* preukázaná zmesná infekcia dvoma izolátmi fytoplazmy, ktoré sa od seba líšili v dvoch variabilných miestach.

Následnou fylogenetickou analýzou nukleotidových sekvencií českých izolátov a sekvencií dostupných v databáze GenBank pomocou Neighbor-Joining metódy došlo k rozdeleniu charakterizovaných izolátov ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ do dvoch homogénnych vetiev (Obr. 7). Najobsiahlejšia bola prvá vetva, ktorú tvorilo 23 izolátov pôvodom z brestov aj hmyzích jedincov (méry *Cacopsylla ulmi* a peniarky *Aphrophora alni*) zo stredných a východných Čiech ako aj strednej a južnej Moravy, pričom tieto izoláty sa vyvetvili spolu s dvoma izolátmi ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ (EY1 a EY_NY). Druhú vetvu tvorili tri izoláty z východných Čiech.



Obrázok 7: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií *secA* génu

Legenda: Fylogenetický strom vytvorený Neighbor-Joining analýzou nukleotidových sekvencií *secA* génu. Označenie izolátov: názov/kód krajiny pôvodu/GenBank accession number; úsečka znázorňuje 0,5 percentuálnu sekvenčnú divergenciu; znázornená bootstrap hodnota ≥ 70 % získaná pri 500 opakovaníach; testované izoláty vyznačené tučným písmom. Ako outgroup použitá sekvencia *secA* génu pre Periwinkle yellows phytoplasma (JQ911772).

5.6 SecY gén

‘Direct‘ PCR boli u 15 izolátov získané ich FD9f/r produkty a následným sekvenovaním boli získané sekvencie týchto fragmentov o dĺžke 1315 – 1359 bp. U zvyšných izolátov bola prevedená ‘nested‘ PCR, pričom u 15 izolátov boli získané ich FD9f3/r2 produkty. U dvanástich z nich boli po zaklonovaní FD9f3/r2 amplicónov do pGEM-T vektoru a následnom sekvenovaní získané sekvencie týchto fragmentov o dĺžke 1159 – 1182 bp. U zvyšných troch boli s využitím dvoch reverzných primerov na sekvenáciu získané sekvencie tohto fragmentu o dĺžke 1132 – 1295 bp. Sekvencie vykazovali pomerne vysokú variabilitu, pričom ich nukleotidová identita (s výnimkou izolátu 774 pôvodom z méry *Psylla alni*) stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 97,78 – 100 %. BLASTN analýzou sekvencií bola u 29 izolátov z 30 potvrdená ich identita ako ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, pričom nukleotidové sekvencie vykazovali 97 – 99% identitu s referenčným izolátom EY1 (AY197690) a odvodené aminokyselinové sekvencie SecY proteínu o dĺžke 377 – 393 AMK vykazovali v BLASTP analýze 92 – 98% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu EY1 (AAP42333).

V nukleotidových sekvenciách pre *secY* priradených pomocou programu ClustalW bolo, s ohľadom na referenčný izolát EY1 a jeho nukleotidovú (AY197690) a aminokyselinovú (AAP42333) sekvenciu, identifikovaných cez 40 významných variabilných miest. Vysoká variabilita v nukleových sekvenciách viedla v aminokyselinových sekvenciách celkovo k zámenám na 36 miestach. Okrem bežných zámen nukleotidov boli zaznamenané dva prípady inzercie; u dvoch izolátov pôvodom z brestov zo stredných Čiech (izolát 904) a južnej Moravy (izolát 980, klon 1) v pozícii 382 – 387 (‘5 - TTATCA - 3’) a u izolátu 904 ešte v pozícii 612 – 614 (‘5 - TAC - 3’), pričom táto inzercia zasahovala do typovej sekvencie pre druh ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’. U štyroch izolátov z východných Čiech (izolát 771, 776, 624 a 775, klon2) bola zaznamenaná delécia v oblasti 346 – 384, pričom táto delécia sa takisto nachádzala v typovej sekvencii druhu ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’. Celkovo boli variabilné miesta potvrdené v troch zo štyroch typových ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ motívoch pre *secY* gén, tabuľka 8.

U vzorky 774 pôvodom z méry *Psylla alni* boli po zaklonovaní získané tri sekvencie pre *secY* o dĺžke 1154 – 1157 bp a BLASTN analýzou bola preukázaná ich 96% identita s odpovedajúcou sekvenciou *secY* génu pre Alder yellows phytoplasma, izolátom ALY (AY197684).

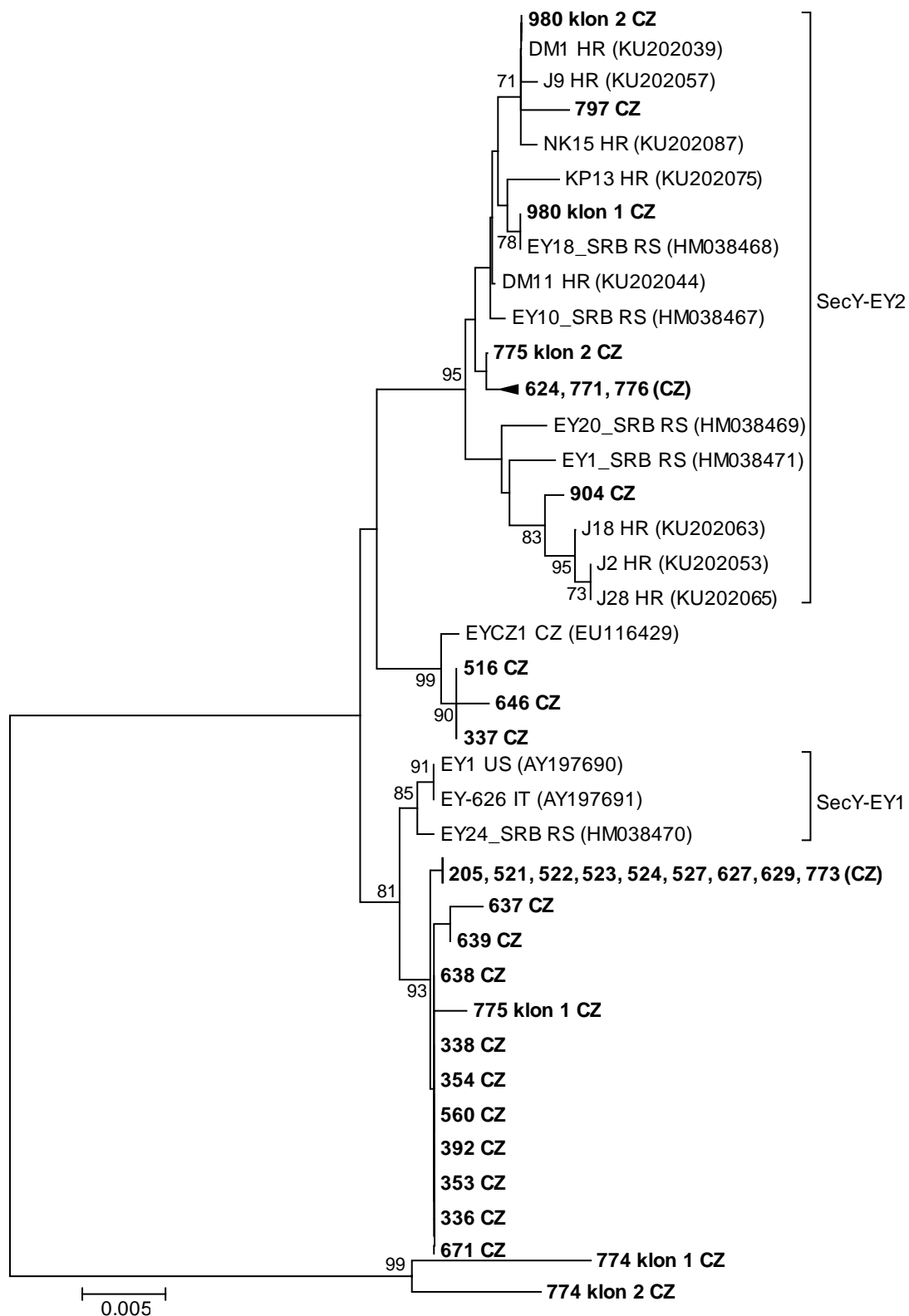
Tabuľka 8: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltacky brestu v unikátnych sekvenčných motívoch *secY* génu charakteristických pre druh ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ (AY197690). (A) oblasť v pozícii 350 – 365, (B) oblasť v pozícii 595 – 614, (C) oblasť v pozícii 616 – 627; tučné písmo – typová sekvencia referenčného izolátu, žltá farba – variabilné miesta

Izolát	Hostiteľ	typová sekvencia (‘5 – 3’)
(A) oblasť v pozícii 350 – 365		
EY1 (AY197690)	<i>Ulmus americana</i>	TTTGATCCAATGTTAA
627	<i>Ulmus minor</i>	TTTGATCCAATGTTAA
629	<i>Ulmus minor</i>	TTTGATCCAATGTTAA
521	<i>Ulmus minor</i>	TTTGATCCAATGTTAA
522	<i>Ulmus minor</i>	TTTGATCCAATGTTAA
904	<i>Ulmus</i> sp.	TCTAATCCAATGTTAA
797	<i>Ulmus</i> sp.	CTGATACAATGTCAA
980	<i>Ulmus glabra</i>	TTTAATCCAATGTTAA
771	<i>Cacopsylla ulmi</i>	-----
(B) oblasť v pozícii 595 – 614		
EY1 (AY197690)	<i>Ulmus americana</i>	GTCTTTCGGTCATGGATT ---GA
627	<i>Ulmus minor</i>	GTCTTTCGGTCATGGATT ---GA
629	<i>Ulmus minor</i>	GTCTTTCGGTCATGGATT ---GA
521	<i>Ulmus minor</i>	GTCTTTCGGTCATGGATT ---GA
522	<i>Ulmus minor</i>	GTCTTTCGGTCATGGATT ---GA
904	<i>Ulmus</i> sp.	GTCTTTAGGTCGTGAATT TACAA
797	<i>Ulmus</i> sp.	GTCTTTAGGTCATGGATT ---GA
980	<i>Ulmus glabra</i>	GTCTTTAGGTCATGGATT ---GA
646	<i>Ulmus</i> sp.	GTCTTTAGGTCATGGATT ---GA
(C) oblasť v pozícii 616 – 627		
EY1 (AY197690)	<i>Ulmus americana</i>	ATTTAGTCTAAT
627	<i>Ulmus minor</i>	ATTTAGTCTAAT
629	<i>Ulmus minor</i>	ATTTAGTCTAAT
521	<i>Ulmus minor</i>	ATTTAGTCTAAT
522	<i>Ulmus minor</i>	ATTTAGTCTAAT
646	<i>Ulmus</i> sp.	ATTTAGTATAAT
338	<i>Ulmus</i> sp.	ATTTAGACTAAT
516	<i>Ulmus</i> sp.	ATTTAGTATAAT
336	<i>Ulmus</i> sp.	ATTTAGACTAAT

Analýzou *secY* boli súčasne u troch vzoriek identifikované odlišné sekvenčné motívy medzi ich jednotlivými klonmi reprezentujúcimi zaklonované FD9f3/r2 amplikóny, čím bola preukázaná prítomnosť zmesných infekcií u týchto vzoriek. Zmesné infekcie boli preukázané u vzorky 774 pôvodom z méry *Psylla alni*, pre ktorú bola identifikovaná zmesná infekcia dvoma izolátmi Alder yellows phytoplasma a u vzoriek 775 pôvodom z méry *Cacopsylla ulmi* a vzorky 980 pôvodom z brestu *Ulmus glabra*, u ktorých boli identifikované zmesné infekcie dvoma odlišnými izolátmi ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’.

Následnou fylogenetickou analýzou nukleotidových sekvenci českých izolátov a sekvenci dostupných v databáze GenBank pomocou Neighbor-Joining metódy došlo k rozdeleniu charakterizovaných izolátov '*Ca. Phytoplasma ulmi*' do troch skupín (Obr. 8). Prvú skupinu tvorilo celkovo osem izolátov (vzorka 980 bola reprezentovaná dvoma variabilnými izolátmi) z geograficky vzdialených oblastí a to zo stredných a východných Čiech ako aj strednej a južnej Moravy, ktoré tvorili jednu skupinu aj na základe fylogénzy ribozomálnych proteínov. Tieto izoláty patrili do jednej SecY-EY2 línie spolu s ôsmimi izolátmi z Chorvátska a štyrmi izolátmi zo Srbska, a predstavovali pomerne variabilnú skupinu, ktorá sa členila na menšie podskupiny, pričom podpora vetví bola nízka. Druhý klaster tvorili tri izoláty z oblasti východných Čiech, ktoré predstavovali pri analýze *secY-map* jednu Map-EY2 líniu a vytvorili skupinu spoločne s EYCZ1 izolátom z Českej republiky. Tento izolát však predstavoval samostatnú vetvu v rámci tejto skupiny. Celá táto skupina pritom nespadała do žiadnej popísanej línie pre *secY* a bola zaznamenaná aj variabilita medzi jednotlivými izolátmi do nej patriacich. Tretiu skupinu tvorilo 20 izolátov zo stredných a východných Čiech a tento klaster sa ďalej vetvil na dve vetvy s vysokou podporou vetvenia. V tejto skupine sa nachádzal aj druhý klon vzorky 775 (reprezentujúci odlišný izolát), a ktorého prvý klon spadal do SecY-EY2 línie. Spolu s touto skupinou sa vetvil aj izolát EY1 z Ameriky, izolát EY-626 z Talianska a izolát EY24_SRB zo Srbska, pričom tieto izoláty patriace do línie SecY-EY1 vytvorili v rámci skupiny samostatnú vetvu.

Pri zostavovaní fylogenetického stromu bol pre jeho sprehládnenie a zjednodušenie vybraný najmenší možný počet klonov reprezentujúcich jednu vzorku v závislosti na ich vnútornej variabilite. V prípade, že sa klony reprezentujúce jednu vzorku vyvetvili do dvoch a viac vetví, boli takéto odlišné klony reprezentujúce odlišnú variabilitu v strome ponechané.



Obrázok 8: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií *secY* génu

Legenda: Fylogenetický strom vytvorený Neighbor-Joining analýzou nukleotidových sekvencií *secY* génu. Označenie izolátov: názov/kód krajiny pôvodu/GenBank accession number; úsečka znázorňuje 0,5 percentuálnu sekvenčnú divergenciu; zobrazená bootstrap hodnota $\geq 70\%$ získaná pri 500 opakovaníach; testované izoláty vyznačené tučným písmom. Ako outgroup použité sekvencie Alder yellows phytoplasma, vzorka 774.

5.7 Gény pre ribozomálne proteíny rpl22 a rps3

Dvojkrokovou PCR boli u 30 izolátov získané F1A/R1A amplikóny a následným sekvenovaním boli získané sekvencie ich F1A/R1A fragmentu o dĺžke 1014 – 1198 bp. Sekvencie vykazovali variabilitu porovnateľnú s variabilitou *tuf* sekvencií, ich sekvenčná identita stanovená pomocou párovej distančnej analýzy (Mega 6.0) bola 98,62 – 100 %. BLASTN analýzou sekvencií bola u všetkých 30 izolátov potvrdená ich identita ako ‘*Candidatus* *Phytoplasma ulmi*’, pričom nukleotidové sekvencie vykazovali 99% identitu s vybraným izolátom EY1 (AY197675). Odvozené aminokyselinové sekvencie rpl22 proteínu o dĺžke 122 – 130 AMK vykazovali v BLASTP analýze 99 – 100% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu EY1 (AAP42386) a odvozené aminokyselinové sekvencie rps3 proteínu o dĺžke 217 – 250 AMK vykazovali v BLASTP analýze 99% identitu s odpovedajúcim proteínom izolátu EY1_SRB (ACD39364).

V sekvenciách pre ribozomálne proteíny rpl22 a rps3 priradených pomocou programu ClustalW bolo, s ohľadom na referenčný izolát ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ EY1 a jeho nukleotidovú (AY197675) a aminokyselinové sekvencie pre rpl22 proteín (AAP42386) a rps3 proteín (AAP42387), identifikovaných trinásť variabilných miest. U jedenástich izolátov (10 izolátov, ktoré tvorili jednu skupinu pri analýze sekvencií pre 16S rRNA spolu s izolátom 775 pôvodom z méry *Cacopsylla ulmi*) boli identifikované štyri spoločné SNP, pričom dva z nich v pozíciách 912 - A/G a 930 - A/G boli nesynonymné a viedli v pozíciách 170 a 176 získaného rps3 proteínu k zamenám aminokyselín N/D a I/V. Tieto dve popísané zámény sa pritom súčasne nachádzali v typovom ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ motíve lokalizovanom do pozície 910 – 932 referenčného izolátu EY1 (AY197675), tabuľka 9. Z tejto skupiny sa vyčlenilo osem izolátov (mimo izoláty 337, 516 a 646), u ktorých boli identifikované dve spoločné variabilné miesta navyše, pričom jedno z nich v pozícii 284 - T/C sa nachádzalo priamo v ďalšom typovom ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ motíve referenčného izolátu EY1 (AY197675) lokalizovanom do pozície 284 – 294, tabuľka 9.

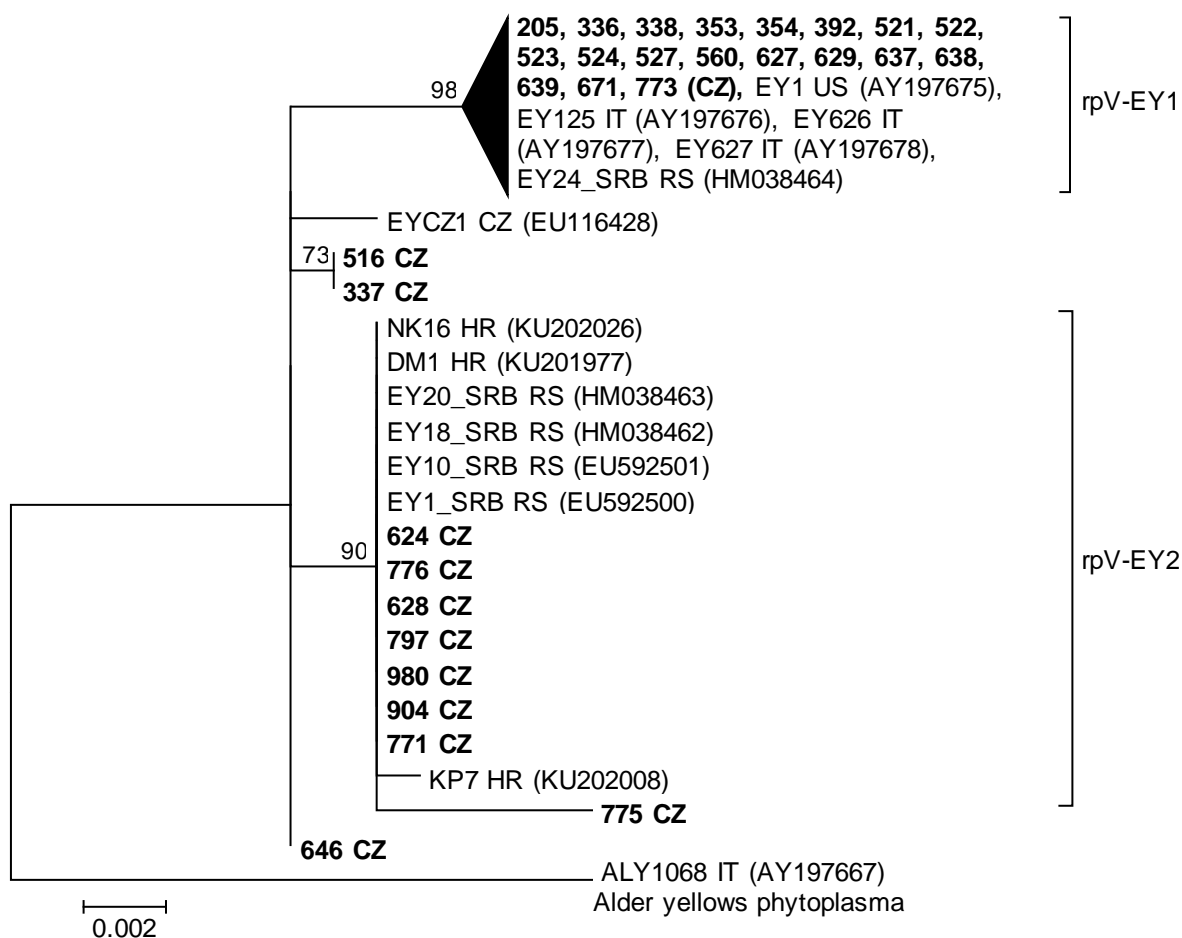
Zo zvyšných SNP boli významné tri, pričom zámena v pozícii 72 - C/T spoločná pre 19 izolátov, ktoré tvorili jednu skupinu aj pri analýze *tuf* génu, bola nesynonymná a viedla v pozícii 15 získaného rpl22 proteínu k zámene P/L; rovnako nesynonymná bola zámena v pozícii 544 - A/G u izolátu 354 pôvodom z brestu z lokality Valdice a viedla v pozícii 47 k zámene Y/C získaného rps3 proteínu; zatiaľ čo tretí SNP špecifický pre izolát 771 pôvodom z méry *C. ulmi* z oblasti východných Čiech predstavoval deléciu v pozícii 533 - T/-.

Tabuľka 9: Porovnanie variability vybraných izolátov fytoplazmy žltáčky brestu v unikátnych sekvenčných motívoch oblasti kódujúcej ribozomálne proteíny *rp122* a *rp3* charakteristických pre druh ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ (AY197675). (A) oblasť v pozícii 284 – 294, (B) oblasť v pozícii 910 – 932; tučné písmo – typová sekvencia referenčného izolátu, žltá farba – variabilné miesta

Izolát	Hostiteľ	typová sekvencia (‘5 – 3’)
(A) oblasť v pozícii 284 – 294		
EY1 (AY197675)	<i>Ulmus americana</i>	TTACGCTTGCC
627	<i>Ulmus minor</i>	TTACGCTTGCC
629	<i>Ulmus minor</i>	TTACGCTTGCC
521	<i>Ulmus minor</i>	TTACGCTTGCC
522	<i>Ulmus minor</i>	TTACGCTTGCC
904	<i>Ulmus sp.</i>	CTACGCTTGCC
797	<i>Ulmus sp.</i>	CTACGCTTGCC
980	<i>Ulmus glabra</i>	CTACGCTTGCC
628	<i>Ulmus minor</i>	CTACGCTTGCC
(B) oblasť v pozícii 910 – 932		
EY1 (AY197675)	<i>Ulmus americana</i>	AAATTCTATTTCTATGGGAAT
627	<i>Ulmus minor</i>	AAATTCTATTTCTATGGGAAT
629	<i>Ulmus minor</i>	AAATTCTATTTCTATGGGAAT
521	<i>Ulmus minor</i>	AAATTCTATTTCTATGGGAAT
522	<i>Ulmus minor</i>	AAATTCTATTTCTATGGGAAT
904	<i>Ulmus sp.</i>	AGATTCTATTTCTATGGGAGT
797	<i>Ulmus sp.</i>	AGATTCTATTTCTATGGGAGT
980	<i>Ulmus glabra</i>	AGATTCTATTTCTATGGGAGT
628	<i>Ulmus minor</i>	AGATTCTATTTCTATGGGAGT

Následnou fylogenetickou analýzou nukleotidových sekvencií českých izolátov a sekvencií dostupných v databáze GenBank pomocou Neighbor-Joining metódy došlo k rozdeleniu charakterizovaných izolátov ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ do troch základných skupín (Obr. 9). Prvú skupinu tvorilo 19 izolátov pôvodom z brestov aj mér *Cacopsylla ulmi* zo stredných a východných Čiech, ktoré sa vyvetvili do spoločnej vetvy, línia *rpV-EY1*, spolu s troma izolátmi z Talianska, jedným zo Srbska a jedným z USA a vytvorili samostatnú skupinu rovnako ako pri analýze *16Sr RNA* a *tuf* génu. Druhú skupinu tvorilo osem izolátov (sedem z nich patrilo do spoločnej *Map-EY3* línie spolu s izolátom 755 z méry *Cacopsylla ulmi*) pôvodom z brestov a troch rôznych druhov hmyzu z lokalít stredných a východných Čiech aj Moravy. Tieto izoláty tvorili spoločný klaster s troma izolátmi z Chorvátska a štyrmi izolátmi zo Srbska a spolu spadali do línie *rpV-EY2*. Tretiu skupinu tvorili tri izoláty pôvodom z brestov z východných Čiech, ktoré v analýze *secY-map* tvorili samostatnú vetvu *Map-EY2*, a ktoré sa vyvetvili spoločne s jedným izolátom z Českej

republiky. Výraznejšia variabilita vnútri skupín bola pozorovaná len v prípade tretej skupiny, ktorá podliehala ďalšiemu vetveniu a rozdelila sa na dve časti.



Obrázok 9: Fylogenetický strom získaný na základe analýzy sekvencií kódujúcich ribozomálne proteíny rpl22 a rps3

Legenda: Fylogenetický strom vytvorený Neighbor-Joining analýzou nukleotidových sekvencií génov pre ribozomálne proteíny rpl22 a rps3. Označenie izolátov: názov/kód krajiny pôvodu/GenBank accession number; úsečka znázorňuje 0,2 percentuálnu sekvenčnú divergenciu; zobrazená bootstrap hodnota ≥ 70 % získaná pri 500 opakovaníach; testované izoláty vyznačené tučným písmom. Ako outgroup použitá sekvencia pre ribozomálne proteíny rpl22 a rps3 pre Alder yellows phytoplasma izolátu ALY1068 (AY197667).

6 Diskusia

Fytoplazma ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ predstavuje významného patogéna pre rastliny rodu *Ulmus* sp. s rozšírením ako po euroázijskom kontinente tak aj v Amerike. Druh ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ bol popísaný v roku 2004 na základe analýzy troch génov pre 16S rRNA, ribozomálne proteíny *rpl22* a *rps3* a *secY*. V rámci jeho popisu boli určené unikátne typové sekvencie tohto druhu vo všetkých troch analyzovaných génoch (Lee *et al.*, 2004a). V nasledujúcom období bolo pri štúdiách zameraných na analýzu genetickej variability tejto fytoplazmy preukázané, že je v Európe diverzifikovanejšia, než bolo pôvodne zaznamenané (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). V súvislosti s tým, bola táto diplomová práca zameraná na analýzu genetickej variability ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ v Českej republike, pričom analyzované boli gény: 16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY*, *secY-map*, *tuf* a *secA*.

Orientačne prevedená RFLP analýza oblasti kódujúcej 16S rRNA preukázala u 19 testovaných izolátov ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’, podskupina 16SrV-A, charakteristický profil pre túto podskupinu, avšak u desiatich izolátov ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’ boli preukázané profily charakteristické spoločne pre podskupiny 16SrV-C/D. Týchto desať izolátov navyše pochádzalo z geograficky vzdialených lokalít stredných a východných Čiech ako aj strednej a južnej Moravy. Až následným Sangerovým sekvenovaním bolo preukázané, že daný profil vykazujú izoláty ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ z dôvodu bodovej mutácie v sekvencii pre 16S rRNA, ktorá vedie k vzniku nového štiepneho miesta pre *BfaI* reštrikčnú endonukleázu. Rovnaká mutácia bola pri štúdiách tejto fytoplazmy zaznamenaná aj v Srbsku, kedy u 23 z 25 izolátov ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ bol získaný profil typický pre podskupiny 16SrV-C/D (Jović *et al.*, 2011). Táto mutácia sa pritom vyskytovala aj u niektorých izolátov z Chorvátska, Nemecka a izolátu z Českej republiky (Navrátil *et al.*, 2009; Eisold *et al.*, 2015; Katanić *et al.*, 2016). Dôvod, prečo bolo v Srbsku zaznamenané vyššie percento výskytu izolátov s touto mutáciou môže mať súvislosť jednak s typom vektora, ktorý môže byť odlišný od vektora v Českej republike, poprípade zdrojom infekcie tohto patogénu v Srbsku, pričom mohlo potenciálne dôjsť k šíreniu z jedného zdroja.

Sekvenčné analýzy troch génov pre 16S rRNA, *rpl22-rps3* a *secY* preukázali, že sekvencie 2/3 českých izolátov vykazovali v spomínaných génoch vysokú identitu práve so sekvenciami izolátov z pôvodnej štúdie (Lee *et al.*, 2004a). Sekvencie 1/3 zvyšných izolátov v týchto génoch však vykazovali identitu s izolátmi zo Srbska (Jović *et al.*, 2011) a z Chorvátska (Katanić *et al.*, 2016) alebo vykazovali jedinečnú, doteraz nepopísanú variabilitu. Súčasne boli pri analýzach odhalené mutácie v niektorých typických ‘*Candidatus*

Phytoplasma ulmi' motívov v sekvenciách všetkých troch génov pre 16S rRNA, *rpl22-rps3* a *secY*. V sekvenciách pre 16S rRNA bola u jednej časti českých izolátov odhalená mutácia v jednom unikátom motíve, čo je v súlade s predchádzajúcimi prácami z Českej republiky (Navrátil *et al.*, 2009), Nemecka (Eisold *et al.*, 2015), Srbska (Jović *et al.*, 2011) a Chorvátska (Katanić *et al.*, 2016). V sekvenciách pre ribozomálne proteíny *rpl22* a *rps3* boli u časti českých izolátov potvrdené mutácie v dvoch unikátnych motívoch, čo sa zhodovalo s variabilitou už popísanou na srbských a chorvátskych izolátoch (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Výnimkou boli tri české izoláty, ktoré mali mutáciu len v jednom z týchto motívov, čím bol charakteristický aj český izolát EYCZ1 (Navrátil *et al.*, 2009), avšak pri ich porovnaní bol rozdiel v pozícii mutácie v tomto motíve a type zámény. V sekvencii *secY* u 'Candidatus Phytoplasma ulmi' bola u českých izolátov preukázaná prítomnosť mutácií v 0 - 3 motívoch (v závislosti na izolátu), pričom mutácie v týchto oblastiach boli zastúpené okrem jednonukleotidových zámien aj deléciou a inzerciou. V rámci *secY* génu preukázali niektoré české izoláty jedinečnú variabilitu, ktorá dodnes nebola popísaná. Táto multigénová analýza súčasne potvrdila zistenia predchádzajúcich autorov (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016), že *secY* gén je najvariabilnejší spomedzi testovaných génov a poskytla tak najdetailnejšie rozlíšenie izolátov.

Zistenia z prevádzaných RFLP analýz a sekvenčných analýz českých izolátov potvrdzujú predchádzajúce názory Jović *et al.* (2011) a Katanić *et al.* (2016), a to: (a) ak pri RFLP analýze sekvencií pre 16S rRNA tejto fytoplazmy chceme získať spoľahlivé výsledky, je nevyhnutné prehodnotiť a aktualizovať súčasne používané kombinácie reštrikčných endonukleáz pri jej jednoznačnej identifikácii; (b) ak chceme naďalej využívať pri jednoznačnej identifikácii 'Candidatus Phytoplasma ulmi' unikátne oligonukleotidové motívy pre gény 16S rRNA, *rpl22-rps3* a *secY*, je nutné upraviť a aktualizovať súčasne používané motívy s ohľadom na doteraz popísanú variabilitu v týchto génoch a zároveň tak aktualizovať aj oficiálny popis druhu 'Candidatus Phytoplasma ulmi' Lee *et al.* z roku 2004.

Analýza ďalšej oblasti, konkrétne *secY*-map lokusu u druhu 'Candidatus Phytoplasma ulmi', bola využitá už pri štúdiách v Srbsku, Chorvátsku a Francúzsku (Arnaud *et al.*, 2007; Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Analýzy toho lokusu na českých izolátoch viedli ako aj u analýz predchádzajúcich génov k odhaleniu vyššej variability, než bola doteraz popísaná, zároveň však neposkytli detailnejšie rozlíšenie izolátov než analýza *secY*. Ďalší gén použitý pri analýze variability 'Candidatus Phytoplasma ulmi' predstavoval tuf gén. Tento gén bol napríklad využitý Marcone *et al.* (2000) pri štúdiách evolučných vzťahov a za účelom klasifikácie u skupiny Aster yellows (16Sr-I). Pre druh 'Candidatus Phytoplasma ulmi' bol

doteraz využitý len okrajovo pre doplnenie analýz a preto nie je v súčasnosti pre tento gén v spojitosti s touto fytoplazmou veľa dostupných informácií. Analýza variability tuf génu v tejto práci umožnila čiastočné rozlíšenie izolátov a hoci ich variabilita nebola taká vysoká ako variabilita *secY* sekvencií, tento gén môže byť použitý ako vhodný marker na doplnujúce analýzy pre izoláty '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Posledný analyzovaný bol *secA* gén, na ktorom boli prevádzané rozsiahle analýzy Hodgetts *et al.* (2008) v rámci taxónu '*Candidatus Phytoplasma*', ale rovnako ako u tuf génu je pre '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' o tomto géne minimum informácií. Využitie univerzálnych primerov pre *secA* navrhnutých Dickinson *et* Hodgetts (2013) viedlo k zisteniu, že tieto primery majú nízku spoľahlivosť detekcie pre túto fytoplazmu. Ako sa uvádza v pôvodnej práci, 'direct' primery môžu viesť k zisku produktov *secA* génu pre baktérie rodu *Wolbachia*, najmä u hmyzích jedincov, čo bolo preukázané aj v tejto práci. Avšak aj využitie 'nested' primerov, reprezentovaných autormi ako spoľahlivých (Dickinson *et* Hodgetts, 2013), v našich podmienkach viedlo k nízkej spoľahlivosti amplifikácie a nevedlo k získaniu špecifických produktov. Použitie nových 'nested' primerov navrhnutých v tejto práci naopak vykazovalo pre české izoláty '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' vysokú úspešnosť. Samotná analýza *secA* génu však neposkytla detailnejšiu diferenciáciu tejto fytoplazmy z dôvodu, že sa jednalo o značne konzervatívny úsek.

Analýza génov, s výnimkou konzervatívnej 16S rRNA oblasti a oblasti kódujúcej ribozomálne proteíny *rpl22* a *rps3*, preukázala prítomnosť zmesných infekcií vzoriek viacerými izolátmi fytoplazmy. Príkladom je analýza génu *secA*, ktorá odhalila prítomnosť zmesnej infekcie fytoplazmou Alder yellows phytoplasma u jednej vzorky pôvodom z méry *Psylla alni*. Analýzy variabilnejších génov pre tuf a *secY*-map lokus odhalili jednu zmesnú infekciu navyše a to u vzorky pôvodom z méry *Cacopsylla ulmi* so zmesnou infekciou izolátmi '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Tri zmesné infekcie boli zistené až vďaka analýze najvariabilnejšieho študovaného *secY* génu a to u predchádzajúcich dvoch vzoriek mér a u vzorky izolovanej zo stromu *Ulmus glabra* Huds. z lokality Dyjákovec, takisto so zmesnou infekciou izolátmi '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Pri analýze variability súboru českých izolátov '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' bolo možné súčasne pozorovať variabilitu medzi izolátmi izolovanými zo vzoriek pochádzajúcich z rôznych oblastí, pričom toto rozrôznenie je považované za dôsledok prebiehajúcej mikroevoúcie tohto patogénu. Hoci z oblasti Moravy bol testovaný iba nízky počet izolátov, priekazne sa líšili v sekvenciách génov pre tuf a *secY* od zvyšných izolátov získaných z hostiteľov z oblasti stredných a východných Čiech. Rovnako bola pozorovaná odlišná variabilita v sekvenciách génu *secY*

u niektorých izolátov zo stredných Čiech oproti tým z východných Čiech. Z analýz takisto vyplýva, že blízky pôvod s referenčným izolátom EY1 majú práve izoláty z oblasti východných Čiech. S ohľadom na preukázanú variabilitu je nutné ale zdôrazniť, že pre celkové zhodnotenie variability danej fytoplazmy v konkrétnom štáte a prípadné odhalenie zmesných infekcií je potrebné prevádzať komplexnú analýzu jednak väčšieho súboru izolátov pochádzajúcich z rôznych lokalít a testovať ich variabilitu na viacero variabilných génov.

V súbore vybraných vzoriek sa nachádzalo celkovo šesť hmyzích jedincov (jedna méra z nich, *Psylla alni*, infikovaná Alder yellows phytoplasma) a 25 brestov infikovaných fytoplazmou '*Candidatus Phytoplasma ulmi*'. Hmyzích zástupcov infikovaných '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' predstavovali štyri méry *Cacopsylla ulmi* a jedna peniarka *Aphrophora alni*. Avšak ani jeden z týchto hmyzích druhov nebol doteraz preukázaný ako vektor tejto fytoplazmy. Stojí tak za zváženie previesť ďalšie štúdiá v tejto oblasti a experimentálne overiť, či tieto hmyzie druhy môžu predstavovať nielen hostiteľov tejto fytoplazmy ale aj jej vektorov. V skupine 25 brestov infikovaných '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' sa v 72 % prípadov jednalo o bezsymptómové infekcie touto fytoplazmou. Vysoký výskyt bezpríznakových infekcií bol pritom zaznamenaný aj pri štúdiách v Chorvátsku, kedy viac ako polovica stromov infikovaných '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' nevykazovala žiadne príznaky infekcie (Katanić *et al.*, 2016). Tieto pozorovania sú zároveň v súlade s obecným predpokladom, že pôvodom európske bresty sú menej vnímavé voči fytoplazmovej infekcii ako tie amerického pôvodu (Sinclair *et al.*, 2000). Na druhej strane pri štúdiách v Srbsku (Jović *et al.*, 2011) nebola u žiadneho z piatich testovaných stromov bez príznakov infekcie preukázaná prítomnosť tohto patogénu. Tieto poznatky však ešte nie je možné aplikovať univerzálne, pretože väčšina štúdií tejto fytoplazmy prevádzaných v Taliansku, Českej republike, Srbsku, Nemecku či Francúzsku bola primárne zameraná na stromy vykazujúce bežné príznaky infekcie a nie stromy bezsymptómové (Mäurer *et al.*, 1993; Marcone *et al.*, 1997; Boudon-Padieu *et al.*, 2004; Arnaud *et al.*, 2007; Navrátil *et al.*, 2009; Jović *et al.*, 2011). Na spoľahlivú determináciu tejto fytoplazmy v Európe a jej distribúcie je preto dôležité analyzovať nielen stromy so symptómami ale aj stromy nevykazujúce žiadne príznaky infekcie.

Predchádzajúce fylogenetické analýzy génov pre 16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY* a *secY-map* v Srbsku a Chorvátsku potvrdili monofyletický pôvod tejto fytoplazmy (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016), čo je v súlade s výsledkami tejto práce. Analýzy týchto génov pritom zároveň viedli k diferenciacii českých izolátov, pričom časť z nich spadala do už popísaných línií spolu s izolátmi zo Srbska, Chorvátska, Talianska, USA, Francúzska (Lee *et al.*, 2004a;

Arnaud *et al.*, 2007; Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Zvyšné tri izoláty sa však pri každej z analýz vyvetvili do samostatnej vetvy a hoci mali podobný pôvod s pomerne atypickým izolátom EYCZ1 a izolátom E04-D438 z Francúzska (u analýzy *secY*-map lokusu), líšili sa aj od nich. Prítom s ohľadom na doteraz detekovanú vysokú variabilitu druhu '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' a jeho širokú geografickú distribúciu je vysoko pravdepodobné, že v nadchádzajúcich rokoch budú detekované ďalšie genotypy tejto fytoplazmy. Vysoká variabilita tejto fytoplazmy preukázaná v Českej republike spolu s jej nízkym dopadom na infikované stromy súčasne podporuje hypotézu, že pôvod tohto patogénu je v Európe (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Vzťah tohto patogénu a jeho hostiteľa vykazujúceho symptómy len u časti infikovaných stromov navyše pripomína vzťah Alder yellows phytoplasma a jej hostiteľa *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., ktorý prešiel pravdepodobne dlhou koevolúciou a vyústil v balancovaný parazitizmus, prejavujúci sa bezsymptómovými infekciami jej hostiteľa (Holz *et al.*, 2016). V prípade, že podobný vzťah je aj medzi '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' a jej hostiteľom, predstavovalo by to ďalší podporujúci faktor hypotézy európskeho pôvodu tejto fytoplazmy. Výskyt bezsymptómových infekcií u brestov súčasne preukazuje, že táto fytoplazma nepredstavuje významné riziko pre bresty ako potvrdili už predchádzajúce práce (Jović *et al.*, 2011; Katanić *et al.*, 2016). Avšak s ohľadom na zmeny klimatických podmienok by mohlo dôjsť k prenosu tejto fytoplazmy na nového vnímavého hostiteľa s významným ekonomickým dopadom, ako tomu bolo napríklad u Alder yellows phytoplasma (Arnaud *et al.*, 2007). Pre lepšie pochopenie a presnejšiu charakterizáciu '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' je ale nutné previesť rozsiahlejšie štúdiá tejto fytoplazmy, a to nielen na izolátoch z Európy, ale aj z Ameriky.

7 Záver

V tejto práci bola na základe analýzy šiestich génov a génových oblastí: 16S rRNA, *rpl22-rps3*, *secY*, *secY-map*, *secA* a *tuf* študovaná variabilita súboru českých izolátov 'Candidatus Phytoplasma ulmi'. Analýza sekvencií pre 16S rRNA potvrdila konzervatívnosť tejto oblasti, u desiatich izolátov 'Candidatus Phytoplasma ulmi' bola detekovaná prítomnosť jednej významnej mutácie (SNP), ktorá viedla k vzniku nového štiepneho miesta pre reštrikčnú endonukleázu *BfaI* a vo výsledku k vzniku nového reštrikčného profilu u týchto izolátov charakteristickému pre podskupiny 16SrV-C/D. Konzervatívne gény pre 16S rRNA, *rpl22-rps3* a aj oblasť lokusu *secY-map* poskytli iba nízke rozlíšenie jednotlivých izolátov, pričom pri fylogenetických analýzach došlo na základe 16S rRNA oblasti k rozdeleniu českých izolátov 'Candidatus Phytoplasma ulmi' do dvoch homogénnych skupín a na základe získaných sekvencií pre ribozomálne proteíny a *secY-map* lokusu došlo k rozdeleniu českých izolátov 'Candidatus Phytoplasma ulmi' do troch konzervatívnych skupín. Detailnejšie rozlíšenie poskytla analýza *tuf* génu, ktorý sa javí ako vhodný doplnujúci marker pri multigénovej charakterizácii 'Candidatus Phytoplasma ulmi'. Najvariabilnejší gén *secY* poskytol pri analýzach najdetailnejšie rozlíšenie izolátov. Pri analýze *secA* génu boli z dôvodu nespoľahlivosti detekcie univerzálnych primerov navrhnuté špecifické priemery pre druh 'Candidatus Phytoplasma ulmi', pričom preukázali vysokú spoľahlivosť detekcie pre analyzované izoláty. *SecA* však predstavoval značne konzervatívny gén a jeho analýza neposkytla detailnejšie rozlíšenie izolátov.

Analýza týchto šiestich génov preukázala, že české izoláty majú vysokú genetickú variabilitu a to ako medzi sebou tak aj v porovnaní s izolátmi zo Srbska, Talianska, Chorvátska, Francúzska a USA. Zároveň analýzami sekvencií bola preukázaná prítomnosť zmesných fytoplazmových infekcií u troch vzoriek, a to u jedného hmyzieho jedinca *Psylla alni*, u ktorého bola preukázaná prítomnosť zmesnej infekcie odlišnými izolátmi Alder yellows phytoplasma a u jedného hmyzieho jedinca *Cacopsylla ulmi* a brestu *Ulmus glabra* Huds., u oboch s preukázanou zmesnou infekciou rôznymi izolátmi 'Candidatus Phytoplasma ulmi'.

Výsledky tejto práce potvrdzujú predchádzajúce tvrdenia, že je nutné prehodnotiť a aktualizovať súčasné používané molekulárne metódy a analytické postupy pre jednoznačnú identifikáciu druhu 'Candidatus Phytoplasma ulmi'.

8 Literatúra

- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. (2001): Flavescence doreé in France and Italy – occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40: 79 – 86.
- 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 doreé phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4001 – 4010.
- Baker W. L. (1949): Studies on the transmission of the virus causing phloem necrosis of American elm, with notes on the biology of its insect vector. *Journal of Economic Entomology* 42: 729 – 732.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo, N. (2014): Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5: 1763 – 1788.
- Bojňanský V. (1969): Elm witches'-broom, a new disease in Czechoslovakia. In: Blatný C. (ed.): Proceedings 6th Conference of the Czechoslovak Plant Virologists, Olomuc 1967, pp. 211 – 213. Academia, Prague 1969.
- Boudon-Padieu E., Larrue J., Clair D., Hourdel J., Jeanneau A., Sforza R., Collin E. (2004): Detection and prophylaxis of Elm Yellows phytoplasma in France. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales* 13: 71 – 80.
- Braun E. J., Sinclair W. A. (1979): Phloem necrosis of elm: symptoms and histopathological observations in tolerant hosts. *Phytopathology* 69: 354 – 358.
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N., Martini M., Osler R. (2004): *Macropsis mendax* (Fieber) as a vector of elm yellows phytoplasma of *Ulmus* species. *Plant Pathology* 53: 90 – 95.
- Credi R., Terlizzi F., Milanesi L., Bondavalli R., Cavallini G., Montermini A., Dradi D., (2006): Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine Bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. In: Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, April 3 – 7 2006, Stellenbosch, South Africa, pp. 182 – 183.
- Daire X., Boudon-Padieu E., Berville A., Schneider B., Caudwell A. (1992): Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence doreé mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology* 121: 95 – 103.

- Daire X., Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E., Alma A., Arzone A., Carraro L., Osler R., Refatti E., Granata G., Credi R., Tanne E., Pearson R., Caudwell A. (1993): Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. *Vitis* 32: 247 – 248.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* 103: 507 – 514.
- Davis R. E., Dally E. L. (2001): Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of Flavescence dorée associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Disease* 85: 790 – 797.
- Davis R. E., Lee I.-M. (1993): Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 1008 – 1011.
- 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 nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiology Methods* 14: 53 – 61.
- Dickinson M., Hodgetts J. (2013): PCR analysis of *Phytoplasmas* based on the *secA* gene. *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 938: 205 – 215.
- 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 the Phytopathological Society of Japan* 33: 259 – 266.
- Eisold A.-M., Kube M., Holz S., Büttner C. (2015): First Report of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' in *Ulmus laevis* in Germany. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 80 (3): 575 – 578.
- EPPO A1 list of pests recommended for regulation as quarantine pests. [online] [navšivené 18.1.2018] Dostupné z <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA1.htm>
- Firrao G., Andersen M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E., Bové J. M., Daire X., Davis R. E., Fletcher J., Garnier M., 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.

- Goidanich G. (1951): Gli scopazzi dell'olmo. *Informatore Fitopatologico* 1(14): 8.
- Griffiths H. M., Sinclair W. A., Boudon-Padieu E., Daire X., Lee I.-M., Sfalanga A., Bertaccini A. (1999): Phytoplasmas associated with elm yellows: molecular variability and differentiation from related organisms. *Plant Disease* 83: 1101–1104.
- Gualaccini F. (1963): Primi risultati esperienze su scopazzi, foglie ad imbuto ed altre anomalie dell'olmo campestre (*Ulmus campestris* L.). *Bollettino della Stazione di Patologia Vegetale di Roma* 21: 25 – 43.
- Gundersen D. E., Lee I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144 – 151.
- Gundersen D. E., Lee I.-M., Schaff D. A., Harrison N. A., Chang C. J., Davis R. E., Kingsbury D. T. (1996): Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 64 – 75.
- Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M. (2008): Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1826–1837.
- Holz S., Duduk B., Büttner C., Kube M. (2016): Genetic variability of alder yellows phytoplasma in *Alnus glutinosa* in its natural Spreewald habitat. *Forest Pathology* 46: 11 – 21. *iPhyClassifier*. [online] [navštívené 12.12.2017] Dostupné z <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>
- Jacobs K. A., Lee I.-M., Griffiths H. M., Miller F. D. Jr, Bottner K. D. (2003): A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Disease* 87: 241 – 246.
- Jarausch W., Jarausch-Wehrheim B., Danet J. L., Broquaire J. M., Dosba F., Saillard C., Garnier M. (2001): Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology* 107: 209 – 217.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Petrović A., Krnjajić S., Toševski I. (2008): New strain of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' infecting *Ulmus minor* and *Ulmus laevis* in Serbia. *Plant Pathology* 57 (6): 1174 – 1174.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Petrović A., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2010): Genetic variability among 'Candidatus Phytoplasma ulmi' strains infecting elms in Serbia and survey of potential vectors. In: Bertaccini A., Laviña A., Torres E. (eds.): *Current*

- status and perspectives of phytoplasma disease research and management, Work Groups 1 – 4 meeting, COST Action FA0807, Sitges, Spain, 18 – 18.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Petrović A., Krstić O., Toševski I. (2011): Multigene sequence data and genetic diversity among ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ strains infecting *Ulmus* spp. in Serbia. *Plant Pathology* 60: 356 – 68.
- 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 witches’-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1037 – 1041.
- Katanić Z., Krstin L., Ježić M., Zebec M., Čurković-Perica M. (2016): Molecular characterization of elm yellows phytoplasmas in Croatia and their impact on *Ulmus* spp. *Plant Pathology* 65 (9): 1430 – 1440.
- Kláštorský I. (1951): A cowl-forming virosis in roses, lime-trees and elm-trees. *Studia Botanica Čechoslovaca* 12: 73 – 171.
- Lee I.-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D. E., Davis R. E., Mittempergher L., Conti M., Gennari F. (1995): Detection and characterization of phytoplasmas associated with disease in *Ulmus* and *Rubus* in northern and central Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 34: 174 – 183.
- Lee I.-M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221 – 255.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I. M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153 – 1169.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bottner K. D., Marcone C., Seemüller E. (2004b): ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1037 – 1048.
- 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 – 42.
- Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S. F. (2004a): 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 (2): 337 – 347.
- 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., Lee I.-M., Davis R. E., Ragozzino A., Seemüller E. (2000): Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1703 – 1713.
- Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. (1996b): Detection of an elm yellows-related phytoplasma in eucalyptus trees affected by little-leaf disease in Italy. *Plant Disease* 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. *European Journal of Forest Pathology* 27: 45 – 54.
- Marcone C., Ragozzino A., Schneider B., Lauer U., Smart C. D., Seemüller E. (1996a): Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches’-broom disease. *Plant Disease* 80: 365 – 371.
- Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A. (1999): Identification and epidemic distribution of two Flavescence doreé-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease* 83: 925 – 930.
- Matteoni J. A., Sinclair W. A. (1985): Role of mycoplasmal disease, ash yellows, in decline of white ash in New York State. *Phytopathology* 75: 355 – 360.
- Mäurer R., Seemüller E. (1995): Nature and genetic relatedness of the mycoplasma-like organism causing rubus stunt. *European Journal of Plant Pathology*. 44: 244 – 249.
- Mäurer 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.
- Mittempergher L. (2000): Elm Yellows in Europe. In: Dunn C. P. (ed.). *The elms breeding, conservation, and disease management*, pp. 110 – 119. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Murolo S., Romanazzi G. (2008): Infections of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ in *Ulmus parvifolia*, *Ulmus* sp. and *Zelkova serrate* trained as bonsais. *Journal of Plant Pathology* 90 (2): 345 – 349.

- Murray R. G. E., Schleifer K. H. (1994): Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of Procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 174 – 176.
- Naderali N., Nejat N., Vadamalai G., Davis R. E., Wei W., Harrison N. A., Kong L., Kadir J., Tan Y.-H., Zhao Y. (2017): ‘*Candidatus* Phytoplasma wodyetiae’, a new taxon associated with yellow decline disease of foxtail palm (*Wodyetia bifurcate*) in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 3765 – 3772.
- Navrátil M., Šafařová 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: 37 – 42.
- Padovan A. C., Gibb K. S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R. E., Magarey P. E., Sears B. B. (1995): Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grape vine yellows phytoplasma from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 25 – 31.
- Pisi A., Marani F., Bertaccini A. (1981): Mycoplasma-like organisms associated with elm witches’ broom symptoms. *Phytopathologia Mediterranea* 20: 189 – 91.
- Reinert W. (1999): Detection and further differentiation of plant pathogenic phytoplasmas (Mollicutes, Eubacteria) in Germany regarding phytopathological aspects. PhD dissertation. Dem Fachbereich Biologie, Technischen Universität Darmstadt, Darmstadt.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C. D., Kirkpatrick B. C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S., Tully J. G. (eds.): *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Volume I, pp. 369 – 380, Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Sinclair W. A., Braun E. J., Larsen A. O. (1976): Update on phloem necrosis of elms. *Journal of Arboriculture* 2: 106 – 113.
- Sinclair W. A., Townsend A. M., Griffiths H. M., Whitlow T. H. (2000): Responses of six eurasian *Ulmus* cultivars to a North American Elm yellows phytoplasma. *Plant Disease* 84: 1266 – 1270.
- Swingle R. U. (1938): A phloem necrosis of elm. *Phytopathology* 28: 757 – 759.
- Torres E., Botti S., Rahola J., Martin M. P., Bertaccini A. (2005): Grapevine yellows diseases in Spain: eight years survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62: 127 – 133.
- Weintraub P. G., Beanland L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91 – 111.

- Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L., Petzel J. P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T. G., van Etten J. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171: 6455 – 6467.
- Win N. K. K., Lee S. Y., Bertaccini A., Namba S., Jung H. Y. (2013): '*Candidatus* *Phytoplasma balanitae*' associated with witches' broom disease of *Balanites triflora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 636 – 640.
- Zhu S. F., Hadidi A., Gundersen D. E., Lee I.-M., Zhang C. L. (1997): Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches'-broom diseases in China. *Acta Horticulturae* 472: 701 – 714.