

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium genetické variability fytoplazem

Bc. Helena Čermáková

Vedoucí práce: Ing. Jana Fránová, Dr., BC AV ČR, v.v.i. / ÚMBR

České Budějovice, 2011

Čermáková H. 2011. Studium genetické variability fytoplazem [The Study of the genetic variability of phytoplasmas] – 53 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Phytoplasmas are bacterial intracellular plant pathogens that cause devastating yield losses in diverse crops worldwide. Phytoplasmas were detected in clover and *Catharanthus roseus* plants, pear, apple and apricot trees. *SecA* and 16S rRNA genes, spacer region and 23S rRNA gene of five phytoplasma isolates were sequenced.

Tato práce byla financována prostředky z grantu MŠMT OC09021 a GA AV ČR AV0Z50510513 a z příspěvku Katedry genetiky PřF JU.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 28.4. 2011.

.....

Helena Čermáková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Janě Fránové, Dr. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost. Dále děkuji laborantkám Aleně Matyášové a Mgr. Olze Baudysové za pomoc a přátelskou atmosféru v laboratoři rostlinné virologie ÚMBR. Velmi děkuji své rodině a blízkým, kteří mi byli po celou dobu studia oporou.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 6 |
| 2. Literární přehled | 8 |
| 2.1. Fylogenetické zařazení | 8 |
| 2.2. Morfologie | 8 |
| 2.3. Molekulární charakteristika | 9 |
| 2.4. Metody studia a klasifikace fytoplazem | 10 |
| 2.4.1 Klasifikace fytoplazem podle symptomů a hostitelů | 11 |
| 2.4.2 Fluorescenční mikroskopie | 11 |
| 2.4.3 Elektronová mikroskopie | 12 |
| 2.4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a real-time PCR | 12 |
| 2.4.5 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) | 13 |
| 2.4.6 Stanovení sekvence DNA (sekvencování) | 14 |
| 2.5. Životní cyklus fytoplazem a jejich šíření | 14 |
| 2.6. Příznaky fytoplazmové infekce | 16 |
| 2.7. Ochrana proti šíření fytoplazmových onemocnění | 17 |
| 3. Materiál a metody | 18 |
| 3.1. Materiál | 18 |
| 3.2. Izolace DNA | 19 |
| 3.2.1 Izolace DNA pomocí kitu Nucleospin Plant | 19 |
| 3.2.2 Izolace DNA chloroform-fenolovou metodou | 20 |
| 3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 22 |
| 3.3.1 Primery použité pro PCR | 22 |
| 3.3.2 Použité amplifikační programy | 23 |
| 3.3.3 Sekvence použitých primerů | 25 |
| 3.4. Analýza polymorfismu délkových fragmentů (RFLP) | 26 |
| 3.5. Sekvencování | 27 |
| 3.5.1. Purifikace DNA | 27 |
| 3.6. Příprava reagensů | 28 |

| | |
|--|----|
| 4. Výsledky a diskuze | 30 |
| 5. Závěr | 32 |
| Použitá literatura | 34 |
| Přílohy | 43 |
| Příloha 1: <i>Předběžný výpis</i> | 44 |
| Příloha 2: <i>Předběžný výpis</i> | 46 |
| Příloha 3: <i>Výsledek porovnání sekvence genu</i> | 48 |
| Příloha 4: <i>Obrazová část</i> | 50 |

1. Úvod

Fytoplazmy jsou patogenní mikroorganismy rostlin. Onemocnění, která způsobují, byla dlouho považována za projevy virových infekcí, a to až do roku 1967, kdy tým japonských vědců (Doi a kol., 1967) zveřejnil objev bakterií bez buněčné stěny, ohraničených pouze jednotkovou, trojvrstevnou plazmatickou membránou. Tyto mikroorganismy pozorované ve floémových buňkách rostlin mohou mít kulovitý, oválný či pleiomorfní tvar a dosahují velikosti okolo 500 nm (Doi a kol., 1967; Ishiie a kol., 1967), pokud jsou partikule podlouhlé, dosahují délky až 1600 nm.

Ačkoliv byly fytoplazmy objeveny až v druhé polovině šedesátých let dvacátého století, zmínky o chorobných příznacích označované jako „žloutenky“ pochází už z roku 1800. Dokumenty z roku 1900 neklamně popisují příznaky onemocnění coconut lethal yellowing (LY), které, jak se později ukázalo, způsobují fytoplazmy. Letální žloutnutí kokosových palm je i v současnosti nejzávažnějším onemocněním nejen kokosových palm karibské oblasti, ale nejméně i dalších 35 druhů amerických palm (Llauger a kol., 2010). Fytoplazmy napadají pouze exotické plodiny, ale i planě rostoucí druhy a celou řadu hospodářsky významných rostlin. Jako další příklad zničení sklizně může sloužit případ z Kalifornie z roku 1959, kdy odumřelo přes milion hrušní následkem fytoplazmové choroby odumírání hrušní. Stromy, které tehdy nákazu přežily, měly snížený výnos prodejných plodů (Hibino a Schneider, 1970). Z nedávné doby stojí za zmínku případ naprosté devastace úrody kávy v Kolumbii, když se v tamních plantážích v letech 1998 (rostliny *Coffea arabica* L.) a 2002 (*Cordia alliodora*) rozmohlo fytoplazmové onemocnění kadeřavosti kávovníku (Mejia a kol., 2010).

Fytoplazmy napadají přibližně 700 rostlinných druhů a jejich výskyt je hlášen téměř z celého světa. V Evropě snižuje výnosy hroznového vína fytoplazma zlatého žloutnutí révy (flavescence dorée phytoplasma), a to zejména ve francouzských a italských vinařských oblastech. Poměrně běžný je i výskyt fytoplazmových onemocnění hrušní (pear decline phytoplasma) a jabloní (apple proliferation phytoplasma), postihujících ovocné sady celé Evropy. Fytoplazma způsobující tzv. evropské žloutnutí peckovin (European stone fruit yellows phytoplasma) napadá běžně pěstované odrůdy peckovin Starého kontinentu – zejména meruňky a broskvoně. Na území Eurasie se pěstitelé potýkají také s fytoplazmou stolburu, původcem závažné choroby brambor, tabáku, rajčat, pepře, ale i vinné révy, avokáda a olivovníku. Fytoplazma žloutenky aster

(aster yellows phytoplasma) má široký okruh hostitelských rostlin a svým rozšířením zasahuje i na území Ameriky. V Austrálii a Novém Zélandu je rozšířena fytoplasma letálního žloutnutí jahod (Strawberry lethal yellows phytoplasma). Se vzrůstajícím zájmem o výzkum těchto patogenů jsou neustále popisovány nálezy nových druhů fytoplazem. V USA na území států Oregonu a Washingtonu byla nedávno objevena nová fytoplasma, Columbia Basin potato purple (PPT), která způsobuje závažné onemocnění brambor a která má vzhledem k rozsáhlému geografickému výskytu hmyzích přenašečů vysoký potenciál ke svému šíření (Wu a kol., 2010).

Závažnost onemocnění je i díky snadnému a rychlému šíření fytoplazem prostřednictvím hmyzu značná. Proto byly fytoplazmy zahrnuty do seznamu karanténních patogenů, na které se dle zákona č. 147/1996 Sb. vztahuje ohlašovací povinnost. Na našem území byli mezi karanténními patogeny zařazeni původci choroby chřadnutí hrušní, proliferace jabloně, evropského žloutnutí peckovin a stolburu brambor (Růžička, 2008).

Ozdravení rostlin napadených fytoplazmami je velmi problematické. Nejdůležitější je fytoplazmovým chorobám předcházet. Riziko infekce lze snížit použitím zdravých výchozích šlechtitelských materiálů, eliminací hmyzu který fytoplazmy přenáší a odstraňováním rostlin s projevy choroby. Největší význam v boji s fytoplazmovou nákazou však pravděpodobně spočívá v ve výzkumu, šlechtění a pěstování odrůd, které by byly vůči fytoplazmám málo vnímavé či dokonce rezistentní (Cousin a Boudon - Padieu, 2002).

Fytoplazmy nelze kultivovat na živných půdách. Přítomnost těchto patogenů v rostlinách však lze jednoznačně prokázat s použitím metod molekulární biologie. Neustále jsou optimalizovány diagnostické metody, umožňující nejen fytoplazmy v rostlinné tkáni zaznamenat, ale i přesně určit. Především díky fylogenetickým analýzám založených na studiích vybraných genů rychle přibývají poznatky o vývoji a příbuznosti fytoplazmových skupin. Nové genetické markery se pak v praxi uplatní například při rostlinolékařských kontrolách při dovozu a vývozu rostlin a šlechtitelského materiálu.

K metodám, které se v současnosti používají k detekci a identifikaci fytoplazem nejčastěji, patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a následné štěpení naamplifikované DNA restrikčními enzymy (RFLP). Sekvencování se uplatňuje zejména při studiu diverzity fytoplazem a hledání specifických markerů.

Cílem předkládané práce bylo pomocí molekulárních metod studovat genetickou variabilitu fytoplazem, získaných ze vzorků rostlin z různých lokalit České republiky.

Splnění tohoto cíle vyžadovalo praktické zvládnutí následujících metod a postupů:

- izolaci DNA (chloroform-fenolovou metodou, pomocí kitu Nucleospin Plant),
- detekci přítomnosti fytoplazem pomocí PCR (direct, nested),
- identifikaci fytoplazem restričním štěpením různými enzymy,
- amplifikaci genu 16S rDNA, mezerníku, genu 23S rDNA a genu *secA* různými primery,
- přípravu vzorků k sekvencování, úpravu a zpracování sekvencí pomocí počítačového programu Vector NTI, vyhledání analogických sekvencí v genové databázi NCBI a zjištění genetické variability vlastních vzorků pomocí programu AlignX,
- doplnění genové databáze o sekvence českých izolátů.

2. Literární přehled

2.1. Fylogenetické zařazení

Fytoplazmy byly dříve na základě morfologické podobnosti s mykoplazmami napadajícími živočichy nazývány „mycoplasma-like organisms (MLO)“.

Termín „fytoplazma“ byl navržen a obecně přijat v 90. letech. Od roku 2004 se prosadilo označení druhu '*Candidatus Phytoplasma*', a to na základě sekvenční příbuznosti 16S rDNA. Fytoplazmy se taxonomicky řadí do třídy *Mollicutes* a oddělení *Tenericutes*. Molekulárními analýzami genu pro 16S rRNA byly fytoplazmy rozděleny do 14 skupin a 41 podskupin (Lee a kol., 1998), přičemž počet skupin i podskupin se s přibývajícím poznatky neustále rozšiřuje.

2.2. Morfologie

V elektronovém mikroskopu je možné fytoplazmy pozorovat jako kulovité, oválné či pleiomorfnní útvary (vizte Přílohu 4, obr. 4). V časných stádiích infekce ale mohou být fytoplazmy v rostlin-ných tkáních přítomné i ve vláknitých či větvených formách. Nejběžněji zaujímají tvar oválných částic o velikosti 500 nm (jejich rozměry se ale

mohou pohybovat od 80 do 800 nm), pokud jsou částice protáhlé, dosahují délky až 1600 nm.

Fytoplazmy nejsou ohraničeny buněčnou stěnou, cytosol od okolí odděluje pouze trojvrstevná, 7-10 nm silná lipido-proteinová membrána (Haggis a Sinha, 1978; Doi a kol., 1967; Ishii a kol., 1967).

2.3. Molekulární charakteristika

Dosud byl osekvcován genom 4 druhů fytoplazem. Kompletní genom je znám u fytoplazmy Onion Yellows M (OY-M) (Oshima a kol., 2004), Aster yellows witches' broom (AY-WB) '*Ca. Phytoplasma asteris*' (Bai a kol., 2006), dále pak '*Ca. Phytoplasma australiense*' (Tran-Nguyen a kol., 2008) a '*Ca. Phytoplasma mali*' (Kube a kol., 2008).

Chromosom fytoplazem je velmi malý, jeho velikost se pohybuje od 602 kb u '*Ca. Phytoplasma mali*' až do 879 kb u fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma australiense*'. Nejenže se chromosomy takto malých příbuzných organismů velikostně liší o téměř 300 kb, ale dokonce existuje i zásadní rozdíl v jejich struktuře. U tří osekvcovaných fytoplazem je chromosom kruhový, ale '*Ca. Phytoplasma mali*' má chromosom lineární (Oshima a kol., 2004; Bai a kol., 2006; Tran-Nguyen a kol., 2008; Kube a kol., 2008). Genomové analýzy odhalily, že fytoplazmy ztratily většinu metabolických proteinů, což naznačuje tendenci k silné redukční evoluci fytoplazmových genomů. Navzdory zmenšování genomu během svého druhového vývoje zůstávají fytoplazmy pro rostliny patogenní a schopné šířit se pomocí hmyzu (Ishii, 2010). Fytoplazmový genom je minimální genom zabezpečující základní funkce parazitického organismu, jeho adaptaci na vnější podmínky a evoluci. Obsahuje geny nezbytné pro uskutečnění hlavních molekulárních funkcí, jako jsou replikace, transkripce a translace (Oshima a kol., 2002). Bai a kol. (2006) uvádí, že genetická výbava umožňuje fytoplazmám syntetizovat vlastní membránové fosfolipidy. Důkazem adaptace k parazitickému způsobu života je rovněž absence biochemických cest, např. k tvorbě pentózafosfátu, ale i k syntéze některých aminokyselin (Tran-Nguyen a kol., 2008). Naopak, vzhledem k tak malému genomu fytoplazmy disponují velkým počtem celé řady transportních systémů, které jim umožňují získávat potřebné látky (různé sacharidy, aminokyseliny, zinkové a hořečnaté ionty) od hostitelských rostlin či hmyzu. Je však zřejmé, že genetická výbava se pro metabolické dráhy mezi jednotlivými zástupci liší (Bai a kol., 2006; Kube a kol., 2008).

Okruh hostitelských druhů rostlin je určen interakcí mezi fytoplazmovými membránovými proteiny a mikrofilamenty hmyzu. Jako velmi významný objev v oblasti výzkumu vztahu mezi fytoplazmou a hostitelskou rostlinou je třeba zmínit nalezení proteinu kódovaného fytoplazmovou DNA, pojmenovaného TENGU, který je patrně iniciátorem vzniku chorobných příznaků na rostlině (Namba, 2010). Je proto velmi pravděpodobné, že jeden z hlavních směrů výzkumu fytoplazem bude veden právě ke studiu tohoto faktoru virulence.

U fytoplazem byla prokázána také přítomnost extrachromosomální DNA (nebyla zjištěna u '*Ca. Phytoplasma mali*'). Stejně jako u mnoha bakterií, i u fytoplazem se tato kruhová dvouvláknová DNA označuje jako plazmid. V jedné fytoplazmové buňce jich může být několik. U fytoplazmy OY-M se zjistilo, že plazmid izolovaný z hmyzem nepřenositelné formy neobsahuje 2 otevřené čtecí rámce, které jsou přítomné u téže fytoplazmy přenášené hmyzem. Nabízí se tedy teorie, podle které jsou na plazmidech kódovány geny pro proteiny umožňující šíření hmyzem a ovlivňující specifitu k hostitelským druhům (Nishigawa a kol., 2002; Yoshiko a kol., 2009).

K variabilitě genové struktury a sekvence nepochybně přispívají i mobilní genetické elementy (Namba, 2010).

Od mykoplazem způsobujících onemocnění lidí a zvířat se fytoplazmy odlišují přítomností tzv. spacer regionu, neboli mezerníku, mezi ribosomální oblastí 16S a 23S. Tento mezerník představuje úsek veliký přibližně 300 bp a kóduje isoleucin tRNA (tRNA^{Ile}) a část sekvence pro alanin tRNA (tRNA^{Ala}). Sekvencování všech rRNA genů dvou fytoplazmových kmenů vedlo k objevu unikátního znaku fytoplazem, a to že tRNA kódující aminokyseliny valin a asparagin jsou umístěny směrem od 5'S rRNA směrem k 3' konci.

Fylogenetické studie předpokládají, že společný předek fytoplazem je *Acholeplasma laidlawii*, u které kóduje tryptofan triplet UGG. U ostatních prokaryot zahrnující také mykoplazmy a spiroplazmy je tryptofan kódován tripletem UGA (Bertaccini, 2007).

2.4. Metody studia a klasifikace fytoplazem

Fytoplazmy byly objeveny v roce 1967 v preparátu pozorovaném v elektronovém mikroskopu. V 70. letech rozvíjející se elektronová mikroskopie umožnila vhléd do životního cyklu fytoplazem. Pozorovány byly v sítkovicích a floému rostlin, ve hmyzích

hostitelích a vznikla řada studií o šíření fytoplazmových infekcí. Až do 80. let neexistoval exaktní systém klasifikace fytoplazem. Fytoplazmy se například rozlišovaly na základě svých biologických vlastností. Avšak revoluce molekulární biologie přinesla řadu nových technik (purifikace DNA, polymerázová řetězová reakce, hybridizace DNA apod.), jejichž zdokonalení během několika let přineslo (a neustále přináší) nesmírně velké množství informací o biologii a taxonomii fytoplazem (Galleto a kol., 2010).

2.4.1 Klasifikace fytoplazem podle symptomů a hostitelů

Fytoplazmy se dosud nepodařilo kultivovat *in vitro*, a protože je není možné rozlišit či dokonce klasifikovat podle fenotypových znaků, byly fytoplazmy dlouho popisovány a rozdělovány do skupin na základě jejich biologických vlastností. Rozlišování fytoplazem podle jejich specifity k hostitelským druhům rostlin a hmyzu a hodnocení příznaků, které na hostitelských rostlinách vyvolávají, však bylo časově náročné, pracné a někdy i nespolehlivé (Lee a Davis, 1992; Lee a kol., 1992). V přírodě navíc bývají rostliny infikovány dvěma i více patogeny současně. Směsné infekce mohou vyvolat atypické příznaky, které znesnadňují určit příčinu choroby vizuálně (Wei a kol., 2010).

Ačkoliv různé druhy fytoplazem kolonizují pouze vybrané druhy rostlin, většina je schopna infikovat rostlinu *Catharanthus roseus* (barvínek růžový). Z toho důvodu se v laboratorních podmínkách *C. roseus* využívá jako indikátorová rostlina. Na infekci různými fytoplazmami reaguje vytvořením odlišných symptomů. Z nemocné rostliny je možné fytoplazmy na *C. roseus* přenést haustórií parazitické rostliny kokotice (*Cuscuta spp.*), roubováním nebo hmyzími vektory. V současnosti je na Instituto di Patologia Vegetable (Bologna, Itálie) pro vědecké účely udržována celosvětová sbírka fytoplazem (Bertaccini, 2003) kultivovaných na *C. roseus* v *in vitro* podmínkách.

2.4.2 Fluorescenční mikroskopie

K detekci, nikoliv však k identifikaci fytoplazem, může dobře posloužit fluorescenční mikroskopie. Z fixovaných vzorků testovaných rostlin (stonky, hlavní žilky listů, kořeny apod.) je nutné zhotovit tenké řezy (10 – 15 μm), které se následně barví DNA fluorochromem (DAPI) a bezprostředně po obarvení se preparáty prohlížejí ve fluorescenčním mikroskopu. Přítomné fytoplazmy se jeví jako výrazné bílo-modře fluoreskující body a shluky v sítkovicích. Metoda však klade vysoké nároky na zkušenosti diagnostika, který musí rozlišit případnou fytoplazmu od fluoreskujících

nukleových kyselin přítomných v rostlinných buněčných organelách nebo jiných organismů (bakterií) (Fránová, 2008).

2.4.3 Elektronová mikroskopie

K pozorování fytoplazem je možné využít skenovací (SEM) i transmisní (TEM) elektronovou mikroskopii. Obě metody vyžadují vysoké pořizovací náklady na vybavení i na složitou přípravu vzorků. Podobně jako v případě fluorescenční mikroskopie, i při těchto technikách musí být pracovník vyhodnocující vzorky velmi zkušený.

Pro skenovací elektronovou mikroskopii je třeba vzorky odebrané z části rostlin fixovat v roztoku glutaraldehydu a následně postfixovat fosfátovým pufrům s oxidem osmičelým. Po odvodnění vzorku dehydratačními činidly, vysušení a pokovení zlatem, platinou nebo paladiem, je možné na zhotovených snímcích lokalizovat fytoplazmy v rostlinných pletivech a určit jejich tvar a velikost. Pozorování však často ztěžují nitrobuněčné struktury a artefakty, které mohou být od fytoplazem svojí morfologií obtížně odlišitelné. Přestože je tato metoda některými autory (Lebsky a kol., 2009) při prokazování fytoplazem používána, z výše uvedených důvodů není pro detekci ani identifikaci fytoplazem vhodná.

Vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii se připravují ještě složitěji. Z vysušené rostlinné tkáně zalité speciální pryskyřicí se po dvou dnech polymerace zhotoví 300-500 nm tenké řezy, které se následně obarví toulidinovou modří. Z části vzorku vhodné pro detailní pozorování se připraví ultratenké řezy o tloušťce 70-90 nm. Na elektronmikroskopických sítkách se vzorky kontrastovanými v roztoku uranylu a citrátu olova je možné jednoznačně rozlišit i jedinou fytoplazmovou částici a to se zvětšením až 500 000-krát. Přestože pozorováním v mikroskopu nelze určit druh sledované fytoplazmy, výhoda této metody spočívá v detekci i jiných rostlinných patogenů – virových částic, rickettsií, bakterií apod. (Fránová, 2008).

2.4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a real-time PCR

PCR je založena na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen

připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. Reakce probíhá v tzv. termocycleru, který opakovaně mění teplotu (Šmarda a kol., 2005). Univerzální i skupinově specifické primery pro detekci fytoplazem byly odvozeny od sekvence genu pro 16S rRNA, navazující oblasti mezerníku, genu pro 23S rRNA a později od sekvencí pro geny ribozomálních proteinů, *secY* a tuf genů a genů kódujících proteiny asociované s membránami fytoplazem (*imp*) (Fránová, 2008).

Klasická PCR je v poslední době často nahrazována tzv. real-time PCR. Výhodná je pro svoji vysokou citlivost a rychlost, což ji předurčuje k testování velkého počtu vzorků. V průběhu reakce je po každém cyklu pomocí detekce fluorescence sledováno množství nově naamplifikovaných částí DNA, takže není nutné po ukončení reakce provádět elektroforézu pro vizualizaci výsledku. V této technice se využívají různé značící látky, které se specificky vážou na cílovou sekvenci amplifikovaného fragmentu. Intenzita zaznamenané fluorescence je úměrná koncentraci amplifikované DNA. Tato metoda umožňuje velmi přesně kvantifikovat průběh a výsledek reakce. Použití real-time PCR pro zjištění fytoplazem se stále zlepšuje. V posledních letech byla tato technika optimalizována pro univerzální detekci fytoplazem na základě amplifikace genu 16S rDNA (Christensen a kol., 2004; Galletto a kol., 2005; Hren a kol., 2007).

2.4.5 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Skupiny a podskupiny fytoplazem lze rozlišit pomocí analýzy délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP). Amplifikované segmenty fytoplazmové DNA se naštěpí za pomoci restrikčních enzymů (např. *AluI*, *HhaI*, *MseI*, *KpnI*, *RsaI*, *SspI*, *TruI*). Díky přítomnosti či absenci restrikčních míst pro daný enzym vzniknou fragmenty DNA o specifických délkách. Naštěpené produkty se separují nejčastěji vertikální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu, barví se etidium bromidem a k vizualizaci se používá UV transiluminátor. Porovnáním restrikčních profilů s kontrolními vzorky nebo literárními údaji je možné danou fytoplazmu identifikovat (Lee a kol., 1998).

2.4.6 Stanovení sekvence DNA (sekvencování)

Cílem sekvencování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Znalost sekvence DNA umožňuje odvodit aminokyselinovou sekvenci kódovaných proteinů a např. detailně stanovit charakter mutací. Povědomí o pořadí nukleotidů je také důležité např. pro PCR, jejíž provedení je na znalosti sekvencí DNA často závislé.

V současné době se při sekvencování používají dvě různé metody. Od tzv. Maxam-Gilbertova (nebo-li chemického) sekvencování se dnes již prakticky upouští, většina přístrojů v současnosti pracuje na principu tzv. Sangerova (enzymatického) sekvencování. Při této metodě je DNA, jejíž sekvence má být stanovena, použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy. Ta totiž vytváří přesné kopie DNA a to ve směru 5' → 3' od primeru s volnou 3'OH skupinou. Syntéza řetězce na matricové DNA je zahájena od místa, ke kterému byl připojen sekvenčně specifický primer pro sekvencování, a ukončena v místě, v němž je do rostoucího řetězce inkorporován místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog 2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP). Ten neobsahuje 3'OH skupinu a působí tak jako koncový inhibitor reakce, protože po jeho inkorporaci do řetězce DNA nemůže DNA-polymeráza začlenit další nukleotid. DdNTP jsou do rostoucího řetězce DNA začleňovány na základě komplementarity bází.

U fytoplazem se nejčastěji stanovuje sekvence oblasti 16S rDNA-23S rDNA, případně genů *secY*, *secA*, *tuf*, a ribozomálních proteinů. (Contaldo a kol., 2010)

2.5. Životní cyklus fytoplazem a jejich šíření

Fytoplazmy ke svému přežití potřebují hypotonické prostředí, které jim zajišťují jednak buňky rostlinného floému a jednak vnitřní prostředí hmyzích vektorů (Bertaccini, 2007). Buňky fytoplazem jsou pleiomorfni a dostatečně malé na to, aby mohly proniknout póry sítkových políček rostlin z jedné sítkovice do druhé. Kolonizují floém všech částí rostlin, včetně květních orgánů (Clark a kol., 1986). Výskyt fytoplazem v různých částech rostliny se v našich klimatických podmínkách během roku mění - v zimním období se koncentrují ve funkčních sítkovicích radiálního floému a na jaře rekolonizují nadzemní části rostliny (Schaper a Seemüller, 1984), u druhů

Prunus se v sítkovicích nadzemních částí nacházejí životaschopné fytoplazmy i během zimních měsíců (Jarausch a kol., 1999).

Mezi běžné hmyzí vektory fytoplazem patří zástupci řádu stejnokřídlých (*Homoptera*), zejména čeledi merovitých (*Psyllidae*), křískovitých (*Cicadellidae*) a žilnatkovitých (*Cixiidae*). Fytoplazmy jsou hmyzími vektory přenášeny tzv. cirkulativním, propagativním a perzistentním způsobem. Fytoplazma se do ústní dutiny bodavě savého hmyzu dostane během dostatečně dlouhého akvizičního sání na infikované rostlině. Dále penetruje epitelové buňky, kde se replikuje v měchýřcích, bazální membránou vstupuje do tělní dutiny, koluje v hemolymfě a opět se pomnožuje. Pokud fytoplazma překoná další membránové bariéry, pronikne do acinárních buněk slinných žláz a dále se pomnoží. Při exkreci slin se během sání dostává do nového hostitele (Tsai, 1979). Alma a kol. (1997) uvádí, že fytoplazmy infikují také hmyzí vajíčka.

Vegetativně se fytoplazmy šíří pomocí roubov z infikovaných rostlin, u nichž probíhá infekce latentně a mohou být zcela bezpříznakové. Běžný je přenos např. hlízami, oddenky, cibulemi a řízky. Některé práce však uvádějí přítomnost fytoplazem i v semenech - konkrétně v embryích palmy kokosové (Cordova a kol., 2003), dále semenech a v semenáčcích vojtěšky (Khan a kol., 2002), a to i přesto, že chybí přímé spojení sítkovic květních částí a vyvíjejícího se embrya. Z hlediska prevence vegetativního šíření fytoplazem je důležité používat zdravé výchozí množitelské materiály. Za tímto účelem se provádí ozdravení pomocí termoterapie a meristémové kultury. Rozmnožovací materiály (rouby) se často máčí ve vodě teplé 45–54 °C po dobu nejméně půl hodiny, maximálně však osm hodin (Bos, 1999).

Některé fytoplazmy jsou přenášeny celou řadou hmyzích vektorů (žloutenku aster přenáší 24 druhů křísů), jiné jsou přenášeny jen několika či dokonce jen jediným druhem (Lee a kol., 2003). Dynamika a efektivita přenosu fytoplazem záleží také na vývojovém stádiu a pohlaví vektora. Samičky křísa *Macrosteles quadrilineatus* přenášejí fytoplazmu žloutenky aster mnohem efektivněji než samečci (Beanland a kol., 1999). Ačkoliv mohou mít fytoplazmy velmi negativní dopad na některé druhy hmyzích vektorů, většinou hmyzu přímo neškodí a dokonce příznivě ovlivňují jejich plodnost a životaschopnost. Studie ukazují, že přítomnost fytoplazem ovlivňuje chování a výběr rostlinných druhů, kterými se hmyz živí (Hogenhout, 2008).

Na rozdíl od rostlinných virů může být většina bakteriálních původců onemocnění citlivá na léčbu antibiotiky, pokud se jedná o mikroorganismy mající vlastní, od

hostitelské rostliny odlišný metabolismus. Fytoplazmy reagují na antibiotika tetracyklinové řady aplikované rostlinám imerzí nebo injekčně. V průběhu léčby tetracyklinem dochází u infikovaných rostlin k ústupu příznaků. Po určité době od ukončení aplikace se však symptomy infekce objevují znovu (Bos, 1999).

2.6. Příznaky fytoplazmové infekce

Fytoplazmy vyvolávají u infikovaných rostlin různé příznaky včetně žloutenky a svinutky listů, chlorózy, malolistosti, proliferace výhonů i kořenů, zakrslosti, květní sterility, virescence, fylodie, odumírání výhonů a celých rostlin (Fialová, 2008). Na napadených rostlinách se však mohou projevovat příznaky v závislosti na druhu fytoplazmy a stadiu infekce. Rozhodující je také druh napadené rostliny, neboť některé rostliny mohou být vůči fytoplazmové infekci tolerantní či rezistentní (Lee a kol., 2000).

Onemocnění se obvykle začíná projevovat prosvětlováním listových žilek. Příčinou je degenerace floému, což má za následek i typické žloutnutí, omezený růst, chřadnutí rostliny a předčasné odumírání. Typický projev fytoplazmového onemocnění je i zvýšený vegetativní růst (metlovitost, *witches' broom*), který může postihnout celou rostlinu, zvláště když je infikována jako mladá. Dalším symptomem je tzv. negativní geotropismus, což znamená, že nové výhony rostlin směřují přímo vzhůru. Specifický příklad rostliny u níž se tento příznak projevuje je podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*). Zdravé rostliny tlačí své semeníky pod zem, kde se vyvíjí v plod, zatímco u fytoplazmou infikovaných rostlin zůstává semeník na povrchu (Bos, 1999).

'*Ca. Phytoplasma mali*', původce onemocnění proliferace jabloně, je rozšířena téměř v celé Evropě. Kromě jabloní napadá i další druhy rodu *Malus*. V poslední době jsou ale hlášeny nálezy této karanténní fytoplazmy na hrušních (Čermáková, 2009; Křížanac, 2010). Příznaky mohou být značně variabilní, často kolísá jejich intenzita, výjimkou není ani dlouhodobá latence či projev onemocnění jen v části koruny. Nápadným projevem je pozdní a často i opakované kvetení, plody se vyvíjí na dlouhých stopkách, je jich méně, bývají menší a v porovnání s plody zdravých stromů mívají i horší chuťovou kvalitu. Stromy se na podzim dříve vybarvují a jsou náchylnější k padlím jabloňovým (*Podosphaera leucotricha*) (Růžička, 2008). Popisována je i tzv. spontánní remise příznaků, ale přestože dojde k eliminaci patogena z koruny, v kořenech zůstávají fytoplazmy životaschopné (Loi a kol., 2002).

'*Ca. Phytoplasma pyri*' (Pear decline phytoplasma) napadá stromy hrušní a způsobuje tzv. chřadnutí hrušní. V některých oblastech je podstatně rozšířenější než fytoplasma proliferace jabloně. Na listech je napadení rozpoznatelné díky jejich nápadnému svinování a chlorotickému zbarvení, listové čepele bývají menší a na konci vegetace dochází často k zavádání, červenání a nakonec hnědnutí listů. Větve napadených stromů mají menší přírůstky, někdy vyholují nebo dochází k metlovitosti. Větve s příznaky napadení předčasně odumírají a později odumírají i celé napadené stromy. U příznaků není popisována spontánní remise (Růžička, 2008). Fytoplazmy chřadnutí hrušně společně s fytoplazmou proliferace jabloně patří do stejné ribozomální skupiny 16Sr X (apple proliferation group).

'*Ca. Phytoplasma prunorum*' (European stone fruit yellows phytoplasma) je původce onemocnění evropského žloutnutí peckovin. V našich podmínkách napadá rostliny rodu *Prunus*, nejčastěji meruňky, méně broskvoně, ojedinělé případy výskytu byly hlášeny u švestky domácí a třešně. V České republice je velké procento infikovaných stromů bezpříznakových. U meruněk se onemocnění projevuje malou násadou květů, chlorotickou svinutkou listů a mírnou až silnou žloutenkou na jednotlivých infikovaných větvích, která se rychle šíří po celé koruně. Listy předčasně opadávají a napadené výhony odumírají. Nemocné stromy odumírají po 1-2 letech po projevení prvních příznaků. Napadeným broskvoním předčasně žloutnou nebo červenají listy a listové čepele se svinují.

'*Ca. Phytoplasma asteris*', původce tzv. žloutenky aster, má široké spektrum hostitelských rostlin a je rozšířena téměř po celém světě. Kromě bylin napadá i celou řadu dřevin a příznaky které způsobuje mají vesměs charakter výše uvedených fyziologických a morfologických změn (Růžička, 2008).

2.7. Ochrana proti šíření fytoplazmových onemocnění

Protože některé fytoplazmy působí značné škody na hospodářsky významných plodinách, byla v r. 1977 přijata karanténní opatření pro řadu fytoplazem, z nichž se na našem území vyskytuje fytoplasma způsobující proliferaci jabloně ('*Ca. Phytoplasma mali*'), onemocnění evropské žloutnutí peckovin (ESFY) ('*Ca. Phytoplasma prunorum*'), chřadnutí hrušně ('*Ca. Phytoplasma pyri*') a stolbur ('*Stolbur Phytoplasma*') (Růžička, 2008).

Nejúčinnějším postupem zabraňujícím šíření fytoplazem zůstávají preventivní

opatření. Fytoplazmy v latentním stádiu infekce nezpůsobují žádné symptomy na hostitelské rostlině a mohou se nepozorovaně šířit vegetativním množením napadené rostliny i šťávu sajícím hmyzem. Důležité je proto používat pro množení rostlin fytoplazem prostý certifikovaný materiál, odstraňovat zdroje infekce, především infikované vytrvalé a dvouleté rostliny, stejně jako všechny příznakové rostliny, omezit pěstování vnímavých druhů a kultivarů vůči fytoplazmám a naopak se zaměřit na tolerantní, méně vnímavé kultivary a kontrolovat výskyt hmyzích vektorů v porostu (Cousin a Boudon - Padieu, 2002).

Výskyt karanténních druhů fytoplazem je monitorován. Rostliny vypěstované v EU uváděné na vnitřní trh mohou pocházet pouze z oblastí prostých karanténních fytoplazem, nebo z lokalit, z nichž nebyly od začátku posledního ukončeného vegetačního období pozorovány žádné příznaky onemocnění způsobeného danou fytoplazmou. Splnění těchto podmínek garantují tzv. rostlinolékařské pasy. Při dovozu rostlin např. u rodu *Malus* ze zemí mimo EU ve kterých se vyskytuje '*Ca. Phytoplasma mali*' jsou pravidla ještě přísnější. Jedním z mnoha požadavků je i podmínka, aby dovážené rostliny byly získány v přímé linii z materiálu udržovaného za odpovídajících podmínek a úředně testovaného s použitím vhodných indikátorových rostlin nebo jiných rovnocenných metod nejméně na tuto fytoplazmu a shledaného prostým této fytoplazmy. Dále musí být doloženo, že na rostlinách v místě produkce nebo náchylných rostlinách v jeho bezprostředním okolí nebyly od začátku tří uplynulých vegetačních období pozorovány žádné příznaky onemocnění způsobeného touto fytoplazmou (Růžička, 2008).

V současné době se rozvíjí nový projekt QBOL financovaný EU FP7, zaměřený na vytvoření databáze pro všechny karanténní rostlinné patogeny a dostupné pro rostlinné diagnostiky (Contaldo a kol., 2010).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

V období od října 2009 do března 2011 bylo na přítomnost fytoplazem testováno 73 vzorků. Většinu vzorků (40) představoval jetel, hrušně (26 vzorků) a jabloně (4 vzorky) různých odrůd, meruňky (2 vzorky) a vinky (1 vzorek). Jetel byl získán od Šlechtitelské

firmy Ing. Hany Jakešové, Csc. z Hladkých Životic, vzorky hrušní a některých jabloní pocházely z východních Čech. Vzorky jabloní a meruněk pro tuto práci poskytli pracovníci prostějovské pobočky Státní rostlinolékařské správy (SRS). Vinka byla v roce 2007 umístěna na zahradě v jižních Čechách, kde zřejmě došlo k přenosu fytoplazmy prostřednictvím neznámého vektora. Vinka je pro experimentální účely udržována ve skleníku oddělení Rostlinné virologie BC AVČR v.v.i.. Tato rostlina byla rovněž zařazena do celosvětové sbírky fytoplazem v Boloni, kde je udržována ve tkáňových kulturách. Zatímco na jeteli s výjimkou jedné rostliny s příznaky fylodie nebyly patrné příznaky fytoplazmového onemocnění, na hrušních bylo zřejmé předčasné červenání, hnědnutí listů a proliferace. Jeden vzorek jabloně byl testován nejen kvůli metlovitosti, ale i kvetení (zelenokvětost a fylodie) v listopadu, což bývá pro fytoplazmová onemocnění jabloní typické. Vzorky meruněk byly předmětem výzkumu pro chlorotickou svinutku listů a mírnou žloutenku. Na vince byly příznaky svědčící o fytoplazmóze: prosvětlování listových žilek, etiolizace listů, zelenokvětost a fylodie (přeměna květů v listům podobné útvary, vizte Přílohu 4, obr. 5).

Z větví dřevin bylo pro izolaci DNA použito lýko a hlavní listové žilky. Izolace DNA z takto připravených vzorků byly provedeny buď ihned, nebo byl takto zpracovaný materiál až do izolace uchováván při -20 °C. Pro izolaci DNA z jetele a vinky byly použity čerstvé listy, krátce po odběru materiálu. Pro izolaci DNA z dřevin a vinky se osvědčila chloroform-fenolová metoda, nebo podstatně rychlejší izolace kitem Nucleospin Plant (Macherey-Nagel), kterou byla izolována DNA i z jetele.

U vzorků, u kterých byly fytoplazmy jednoznačně prokázány pomocí specifických primerů při PCR a analýzou RFLP, byla provedena PCR s kombinacemi specifických primerů tak, aby se oblasti amplifikovaných fragmentů dostatečně překrývaly a bylo tedy možné následným osekvcováním těchto úseků zjistit nepřerušené pořadí nukleotidů genů *secA*, 16S rRNA, mezerníku a genu 23S rRNA.

3.2. Izolace DNA

3.2.1 Izolace DNA pomocí kitu Nucleospin Plant

- pracovní postup byl dodržen podle pokynů výrobce (složení pufrů výrobce neuvádí)

- všechny centrifugační kroky byly prováděny na nechlazené stolní centrifuze (Mini Spin plus Eppendorf) při 11000 otáčkách za minutu, se vzorky bylo manipulováno na ledu
- rostlinná tkáň byla zhomogenizována tloučkem ve třecí misce pomocí tekutého dusíku
- homogenát byl převeden do 1,5 ml zkumavky obsahující 400 μ l pufru PL1
- obsah zkumavky byl promíchán, následně bylo přidáno 10 μ l RNázy a směs byla znovu promíchána
- zkumavka byla vložena na 10 min do termobloku nahřátého na 65 °C
- nahřátý vzorek byl přelit na fialovou kolonku vloženou do 2 ml zkumavky, centrifugováno 5 min
- do 1,5 ml zkumavky bylo připraveno 450 μ l PC pufru, do této zkumavky přelita čirá kapalná látka oddělená centrifugací
- promíchaný vzorek byl přenesen na zelenou kolonku vloženou do zkumavky a centrifugován 75 s
- tekutina byla odstraněna, na kolonku bylo nanášeno 400 μ l pufru PW1 a zkumavka byla znovu centrifugována 75 s
- po odstranění proteklé tekutiny bylo na kolonku nanášeno 700 μ l pufru PW2 a vzorek byl centrifugován 2 min
- kolonka byla předána do čisté zkumavky, na membránu bylo nanášeno 40 μ l pufru PE nahřátého na teplotu 70 °C
- vzorek byl 10 minut inkubován na termobloku při 70 °C, následně centrifugován 75 s
- přefiltrovaná tekutina byla znovu napipetována na střed membrány kolonky a centrifugována 75 s
- proteklá frakce obsahovala přibližně 35 μ l DNA připravené k dalšímu použití.

3.2.2 Izolace DNA chloroform-fenolovou metodou (Lee a kol., 1991)

- 2-3 g čerstvé tkáně byly zhomogenizovány v předchlazené třecí misce s tekutým dusíkem
- bylo přidáno 14 ml grinding pufru
- homogenát byl přecezen přes sílon do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml umístěných v ledové tříšti. Tuhé zbytky byly následně smyty 7 ml grinding pufru

a opět přecezeny.

- filtrát byl centrifugován při 13000 otáčkách po dobu 20 minut při teplotě 4 °C
- po vylití supernatantu byly k peletu přidány 4 ml extrakčního pufru a 40 µl proteinázy K. Pelet byl opatrně resuspendován. Poté bylo přidáno 440 µl sarkosylu
- následovala inkubace ve vodní lázni při teplotě 55 °C po dobu 1 hodiny a 30 minut
- po vyjmutí z vodní lázně byla suspenze centrifugována při 8000 otáčkách po dobu 15 minut a při teplotě 4 °C
- supernatant byl ponechán a bylo k němu přidáno 2,5 ml isopropanolu, se kterým byl velmi opatrně promíchán. Vzorky byly ponechány po dobu 30 minut při teplotě -20 °C, nebo přes noc při teplotě 4 °C
- následně byla provedena centrifugace při 8000 otáčkách po dobu 15 minut a při teplotě 4 °C
- byl ponechán pelet, ke kterému byly přidány 3 ml TE pufru a 75 µl 20% SDS spolu s 30 µl proteinázy K. Tato směs byla opatrně promíchána a inkubována ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny
- poté bylo přidáno 525 µl 5M NaCl a vše bylo důkladně promícháno
- po přidání 420 µl CTAB/NaCl a promíchání byly vzorky inkubovány ve vodní lázni při teplotě 65 °C po dobu 10 minut
- po inkubaci ve vodní lázni byl ke vzorkům přidán chloroform-isoamylalkohol v poměru 24:1
v množství 4 ml. Tato směs byla promíchána a centrifugována při 8 000 otáčkách po dobu 10 minut
- supernatant byl přenesen do nové kyvety a byly k němu přidány 2 ml fenolu a 2 ml chloroformu; směs byla centrifugována při 8000 otáčkách po dobu 10 minut
- supernatant byl opět přenesen do nové kyvety a bylo k němu přidáno 2,5 ml izopropanolu pro precipitaci nukleové kyseliny. Vzorky byly 1 hodinu ponechány při teplotě -20 °C, nebo při 4 °C celou noc
- vzorky byly centrifugovány při 11 000 otáčkách po dobu 20 minut a při teplotě 4 °C, poté byl odstraněn supernatant a ponechán průhledný pelet, který byl omyt 70 % etanolem (pro vymytí CTAB) a centrifugován při 10000 otáčkách a teplotě 4 °C po dobu 10 minut
- po vylití etanolu byly vzorky ponechány 5 minut při pokojové teplotě
- po vysušení byl pelet resuspendován v 50 µl destilované vody.

Poté bylo provedeno spektrofotometrické měření koncentrace a ředění vyizolované DNA:

Ke 4 μl vyizolované DNA bylo přidáno 396 μl vody. U takto připravených vzorků byla měřena absorbance při vlnové délce 260 nm (A_{260}).

Hodnota naměřené absorbance byla dosazena do vzorce $2/(5 \cdot A_{260})$; [μl]. Vypočtené množství koncentrovaného roztoku bylo doplněno ultračistou vodou do objemu 100 μl . Získaná koncentrace naředěného roztoku činila 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro detekci fytoplazem byly použity specifické primery. Při direct PCR byla pro reakci použita DNA o výchozí koncentraci 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Po proběhnutí reakce byla takto naamplifikovaná DNA naředěna v poměru 1:29 μl vody a použita pro nested PCR s další dvojicí (tzv. vnitřních) primerů. Pro další nested PCR bylo postupováno stejným způsobem - produkt nested PCR byl opět naředěn v poměru 1:29 μl a z toho 1 μl byl použit pro další amplifikaci. Při reakci direct i nested PCR byla použita i tzv. negativní kontrola, tedy vzorek připravený stejným způsobem jako ostatní, ale templátová DNA byla nahrazena ultračistou vodou. Tento vzorek slouží ke kontrole, zda nedošlo během přípravy vzorků na PCR ke kontaminaci a amplifikaci jiné než fytoplazmové DNA.

Pro zjištění výsledku reakce byly vzorky nanесeny na 1% agarózový gel, do něhož bylo přidáno barvivo GelRed v poměru 1 μl barviva do 1 ml pufru. Agarózový gel pro 17 vzorků byl připraven z 0,35 g agarózy, 35 ml pufru TBE 1x a obarven 3,5 μl GelRedu. Po zatuhnutí gelu byly nanесeny 2 μl markeru (100 bp) s 1,5 μl barvy a jednotlivé vzorky (po 6 μl) s 1,5 μl barvy. Barva s obsahem bromfenylové modři sloužila pouze ke zviditelnění bezbarvých vzorků v průběhu elektroforézy. Obvykle byly vzorky separovány vertikální elektroforézou 33 minut při 111 V. Vizualizace vzorků byla prováděna osvětlením gelu UV světlem.

3.3.1 Primery použité pro PCR

Pro amplifikaci části genu pro 16S rRNA a mezerníku byly použity následující dvojice primerů:

a) primery pro direct PCR:

P1/P7; P1A/P7A; F1/B6; F2n/R2; fU5/rU3; pc399/pc1694; 16R758F/16R1232R; P1/U3; 16R758F/P7; 16R758F/P7A; P1A/U3; F1/R0; AP13/AP10; rpAP15f/rpAP15r

b) kombinace primerů pro nested PCR:

P1/P7 → F2/R2

P1/P7 → F1/B6

AP13/AP10 → AP14/AP15

Pro amplifikaci genu 23S byly použity tyto primery:

direct P4/P7; P1/Tint; P23/A23R3; P7/A23R3.

Pro amplifikaci genu *secA* byly použity tyto primery:

a) direct PCR: SecAfor1/ SecArev3

b) nested PCR: SecAfor2/ SecArev3

Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala:

Master mix (MM) 12,5 µl (Fermentas)

Primer (1) 0,5 µl

Primer (2) 0,5 µl

H₂O 10,5 µl

DNA izolát 1,0 µl (20 ng)

Použité primery byly naředěny na koncentraci 100 pmol·µl⁻¹.

3.3.2 Použité amplifikační programy

Pro amplifikaci DNA (Mini CyclerTM MJ Research) byly použity různé programy, lišící se v teplotě přisedání primerů, v časovém schématu a počtu opakování cyklů, a to:

a) *Schaff a kol., 1992*

– počáteční denaturace při 94 °C, 2 min

– vlastní cyklus opakováný 35-krát: denaturace při 94 °C, 1 min
annealing při 50 °C, 2 min
extension při 72 °C, 3 min

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro PCR s primery P1/P7; F1/B6; F2n/R2; fU5/rU3; 16R758F/16R1232R; 16R758F /P7; 16R758F /P7A; P1/U3; P1A/U3; F1/R0.

b) *Jarauscha a kol., 2000*

– počáteční denaturace při 95 °C, 1 min

– vlastní cyklus opakováný 40-krát: denaturace při 95 °C, 15 s
annealing při 58 °C, 15 s

extension při 72 °C, 1 min

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 4 min.

Program byl použit pro PCR s primery AP13/AP10; AP14/AP15.

c) *Martini a kol., 2006*

– počáteční denaturace při 94 °C, 2 min

– vlastní cyklus opakovaný 40-krát: denaturace při 94 °C, 1 min
annealing při 55 °C, 45 s
extension při 72 °C, 90 s

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 8 min.

Program byl použit pro PCR s primery rpAP15f/rpAP15r.

d) *Lee a kol., 2004*

– počáteční denaturace při 94 °C, 2 min

– vlastní cyklus opakovaný 35-krát: denaturace při 94 °C, 1 min
annealing při 55 °C, 2 min
extension při 72 °C, 3 min

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro PCR s primery P1A/P7A.

e) *Skrzeczowski a kol., 2001*

– počáteční denaturace při 95 °C, 10 min

– vlastní cyklus opakovaný 33-krát: denaturace při 94°C, 30 s
annealing při 60°C, 1 min
extension při 72°C, 2min

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro primery pc399/pc1694.

f) *Guo a kol., 2000*

– počáteční denaturace při 94 °C, 2 min

– vlastní cyklus opakovaný 35-krát: denaturace při 94 °C, 1 min
annealing při 60 °C, 2 min
extension při 72 °C, 3,5 min

– dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro primery P4/P7, P23/A23R3, P7/A23R3.

g) *Smart a kol., 1996*

- počáteční denaturace při 94 °C, 2 min
- vlastní cyklus opakovaný 30-krát: denaturace při 94 °C, 1 min
annealing při 56 °C, 1 min
extension při 72 °C, 2 min
- dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro PCR s primery P1/Tint.

h) *Hodgetts a kol., 2008*

- počáteční denaturace při 94 °C, 2 min
- vlastní cyklus opakovaný 35-krát: denaturace při 94 °C, 30 s
annealing při 53 °C, 60 s
extension při 72 °C, 90 s
- dosyntetizování řetězců při 72 °C, 10 min.

Program byl použit pro PCR s primery SecAfor1/SecArev3.

3.3.3 Sekvence použitých primerů

P1 5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3' (Deng a Hiruki, 1991)

P7 5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3' (Schneider a kol., 1995)

P1A 5' ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC 3' (Lee a kol., 2004)

P7A 5' CCTTCATCGGCTCTTAGTGC 3' (Lee a kol., 2004)

F2n 5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3' (Gundersen kol., 1996)

R2 5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG (Lee a kol., 1993)

F1(I) 5' TAAAAGACCTAGCAATAGG 3' (Lee a kol., 1994)

R1(I) 5' CAATCCGAAGTACTGAGACTGT 3' (Lee a kol., 1994)

F1 5' AAGACGAGGATAACAGTTGG 3' (Davis a Lee, 1993)

B6 5' TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG 3' (Padovan a kol., 1995)

R0 5' GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC 3' (Lee a kol., 1993)

fU5 5' CGGCAATGGAGGAAACT 3' (Lorenz a kol., 1995)

rU3 5' TTCAGCTACTCTTTGTAACA 3' (Lorenz a kol., 1995)

pc399 5' AACGCCGCGTGAACGATGAA 3' (Skrzeczowski a kol., 2001)

pc1694 5' ATCAGGCGTGTGCTCTAACC 3' (Skrzeczowski a kol., 2001)

16R758F 5' GTCTTTACTGACGCTGAGGC 3' (Gibb a kol., 1995)

16R1232R 5' CTTACGCTACCCTTTGTAAC 3' (Gibb a kol., 1995)

AP13 5' CTACAGATTTTCACACATTGG 3' (Jarausch a kol., 1994)
AP10 5' TTTTCACAACGTATTCCGCC 3' (Jarausch a kol., 1994)
AP14 5' CAGATTTTCACACATTGGTTAT-3' (Casati a kol., 2010)
AP15 5' ATTTTTGTTGTTTTCTACCCAT-3' (Casati a kol., 2010)
rpAP15f 5' AGTGCTGAAGCTAATTTGG 3' (Martini a kol., 2006)
rpAP15r 5' TGCTTTTTTATAGCAAAAGGTT 3' (Martini a kol., 2006)
Tint 5' TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC 3' (Smart a kol., 1996)
SecAfor1 5' GARATGAAAAGTGGGAAGG 3' (Hodgetts a kol., 2008)
SecAfor2 5' GAYGARGSWAGAACKCCT 3' (Hodgetts a kol., 2008)
SecArev3 5' GTTTTRGCAGTTCCTGTCATNCC 3' (Hodgetts a kol., 2008)
A23S3R3 5' ACTTACACACCTGGCCTATCAACC 3' (Guo a kol., 2000)
P23S5F3 5' GTGGATGCCTTGGCACTAAGAGCC 3' (Guo a kol., 2000).

3.4. Analýza polymorfismu délkových fragmentů (RFLP)

Pro orientační určení fytoplazem ve vzorcích byla použita jednoduchá, ale spolehlivá analýza polymorfismu délkových fragmentů. K reakci byl použit enzym *MseI* a *SspI*, které jsou vhodné pro štěpení fragmentů DNA naamplifikovaných PCR s použitím PCR primerů F2n/R2. Enzym *MseI* (BioLabs) štěpí DNA v pozici T↓TAA, enzym *SspI* (Fermentas) v místě AAT↓ATT.

Složení reakční směsi a teplota nutná k inkubaci byla dodržena podle návodu doporučeného výrobcem. U vzorků, u nichž byl výsledek PCR slabý, bylo použito více PCR produktu (3-4 µl).

Pro vertikální elektroforézu byl použit polyakrylamidový gel: 6 ml H₂O; 0,837 ml TBE 10x; 1,75 ml (N,N'-methylenbisakrylamidu, roztok 29:1, AA); 129,1 µl amonium persulfátu (APS); 5 µl TMD (N,N,N',N'-tetramethyletylendiamin).

Do jamek gelu byla nanášena naštěpená směs spolu s 3 µl barvy (Blue/Orange). Použit byl marker 100 pb v množství 0,6 µl na 1 jamku. Elektroforéza probíhala při 145 V po dobu 90 min. Gel byl následně barven v roztoku připraveném z 30 ml destilované vody a 3 µl barviva GelRed. Vizualizace výsledků byla umožněna osvětlením gelu UV transiluminátorem.

3.5. Sekvencování

Vzorky určené k sekvencování bylo nutné zbavit primerů, nukleotidů, polymerázy a solí. Většina vzorků byla přečištěna z PCR produktu, u několika vzorků bylo nutné purifikovat fragmenty vyříznuté z agarózového gelu. Pro přečištění produktů byly použity kity QIAquick a postup doporučený výrobcem. Takto přečištěná DNA byla použita pro přípravu vzorku na sekvenační reakci.

3.5.1. Purifikace DNA

a) *Přečištění DNA fragmentů z PCR produktu použitím kitu QIAquick (QIAGEN):*

- všechny centrifugační kroky byly prováděny při 14000 rpm v nechlazené stolní centrifuze
- k jednomu objemu PCR vzorku bylo přidáno pět objemů pufru PBI
- na QIAquick kolonku umístěnou do 2 ml sběrné zkumavky byla nanášena promíchaná směs vzorku s pufrům
- pro navázání vzorku byla kolonka centrifugována 60 s
- proteklá část byla odstraněna a QIAquick kolonka znovu umístěna zpět do sběrné zkumavky
- k promytí bylo nanášeno 750 μ l pufru PE na QIAquick kolonku, následovala centrifugace 60 s
- po odstranění proteklé frakce byla kolonka umístěna zpět do sběrné zkumavky a znovu centrifugována 2 min
- QIAquick kolonka byla umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky
- na střed membrány bylo nanášeno 30 μ l elution pufru, po minutě stání byla zkumavka s kolonkou centrifugována 60 s

Tento pracovní postup umožnil získat přibližně 28 μ l přečištěné DNA.

b) *Přečištění DNA fragmentů z agarózového gelu použitím kitu QIAquick:*

- všechny centrifugační kroky byly prováděny při 14000 rpm v nechlazené stolní centrifuze
- fragment DNA byl z agarózového gelu vyříznut sterilním, ostrým skalpelem
- k jednomu objemu gelového plátku zváženému ve zkumavce (100 mg ~100 μ l) byly přidány tři objemy pufru QG
- směs byla inkubována při 50 °C 10 min (nebo déle, do rozpuštění gelu)
- ke vzorku byl přidán 1 objem isopropanolu a směs látek byla promíchaná

- na QIAquick kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce byl nanesen vzorek, centrifugace 1 min
- proteklá část byla odstraněna a kolonka umístěna zpět do sběrné zkumavky
- na kolonku bylo nanесeno 0,5 ml pufru QG a centrifugováno 1 min
- na promytí bylo do kolonky napipetováno 0,75 ml Pufru PE a centrifugováno 1 min
- proteklá část byla odstraněna a zkumavka s kolonkou znovu centrifugována 1 min
- kolonka byla umístěna do 1,5 ml zkumavky, přímo na kolonku bylo přidáno 30 μ l pufru PE a po 1 minutě stání znovu následovala centrifugace 1 min

Objem přečištěné DNA byl přibližně 28 μ l.

Pro kontrolu kvality takto přečištěné DNA byl vzorek nanесen na tenký, 1 % agarózový gel obarvený GelRedem (1 μ l barviva na 1 ml gelu), a to v objemu 3 μ l vzorku do jamky. Vizualizace byla umožněna ozářením gelu UV světlem.

Přečištěný DNA produkt byl připraven pro sekvenační reakci takto:

- podle síly bandu bylo použito adekvátní množství vzorku – 2 μ l v případě velmi kvalitního produktu až po 6 μ l, pokud byl na kontrolním gelu band málo zřetelný
- z každého vzorku byly k sekvencování připraveny vzorky dva, každý s jedním z dvojice primerů, primer byl přidán v objemu 0,5 μ l
- množství vzorku byl doplněn ultračistou vodou tak, aby jeho výsledný objem byl přesně 7,5 μ l.

c) *Proces sekvencování*

Takto připravené vzorky byly předány k sekvencování do Laboratoře genomiky Ústavu molekulární biologie rostlin (Ing. Moravcová). Sekvencování bylo provedeno přístrojem ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems. Princip analýzy tímto přístrojem vychází ze Sangerovy enzymatické metody.

Výsledná data ze sekvenační analýzy, která byla laboratoří elektronicky zaslána ve formátu *.abi, byla dále zpracována pomocí programu Vector NTI (ContigExpress).

3.6. Příprava reagensů

a) *Grinding pufr (250 ml)*

| | |
|-----------------------------|---------|
| sacharóza | 25 g |
| PVP (polyvinylpyrrolidon) | 5 g |
| BSA (hovězí sérový albumin) | 0,365 g |

K₂HPO₄ 4,14 g

KH₂PO₄ 1,025 g

Na 100 ml pufru bylo přidáno 0,53 g kyseliny askorbové. Bylo nutné upravit na hodnotu pH 7,6 pomocí roztoku NaOH. Hotový pufr byl uchováván při teplotě 4 °C.

b) *Extrakční pufr (300 ml)*

Tris-HCl 1,211 g

EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ · H₂O) 3,722 g

NaCl 1,416 g

c) *CTAB/NaCl pufr*

NaCl 4,1 g

H₂O 80 ml

CTAB (cetyldimethylethylammonium bromid) 10 g

d) *TBE 10x pufr (500 ml)*

Tris (C₄H₁₁NO₃) 54 g

kyselina boritá 27,5 g

0,5 M EDTA 20 ml

Destilovanou vodou byl roztok doplněn na objem 500 ml. Bylo nutné upravit pH na hodnotu 8,2.

e) *TBE 1x (500 ml)*

TBE 10x 50 ml

Roztok bylo nutné doplnit destilovanou vodou do objemu 500 ml.

f) *APS (amonium persulfát)*

0,1 g APS bylo rozpuštěno v 1 ml vody.

g) *Barva pro elektroforézu na agarózovém gelu*

1 ml glycerolu

200 µl 10x TBE

800 µl vody

200 µl roztoku bromfenylové modři

Směs látek ve zkumavce byla důkladně promíchána.

4. Výsledky a diskuze

Následující pasáž o rozsahu 3 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě.

5. Závěr

Od září 2009 do března 2010 bylo na oddělení rostlinné virologie BC AV ČR, v.v.i., ÚMBR zkoumáno celkem 73 vzorků (40 vzorků jetele, 26 vzorků hrušní, 4 vzorky jabloně, 2 vzorky meruňky a 1 vzorek vinky). Přítomnost fytoplazem byla pomocí PCR jednoznačně prokázána ve 39 případech. Pomocí RFLP s enzymy *MseI* a *SspI* bylo zjištěno, že testované vzorky jetele a vinky byly napadeny fytoplazmou fylogie jetele (16Sr I-C), u hrušní byla prokázána infekce fytoplazmou chřadnutí hrušní (16Sr X-C). Jabloně byly napadeny fytoplazmou proliferace jabloně (16Sr X-A) a u obou testovaných vzorků meruněk byla zjištěna fytoplazma evropského žloutnutí peckovin (16Sr X-B).

Pro sekvencování bylo vybráno pět vzorků: dva vzorky hrušní, jeden vzorek jabloně, vinky a meruňky. Sekvencován byl gen 16S rDNA, oblast mezerníku, gen 23S rDNA a gen *secA*. Gen 16S rDNA s přílehlou oblastí sahající až do úseku genu 23S rDNA byl osekvencován u všech vybraných vzorků. Gen *secA* se podařilo osekvencovat pouze u 3 vzorků, a to jednoho izolátu hrušně, jabloně a meruňky. Tento gen dosud ze žádného izolátu '*Ca. Phytoplasma pyri*' osekvencován nebyl, proto je tento výsledek práce považován za velmi významný. U genu *secA* '*Ca. Phytoplasma prunorum*' osekvencovaného z izolátu meruňky byla zjištěna odlišnost v 18 nukleotidech v porovnání se sekvencemi dostupnými v GenBank, což v poměrně krátkém úseku (360 bp) představuje variabilitu v 5% bazí. Oblast genu *secA* z uvedeného izolátu proto bude předmětem dalšího zkoumání. Gen 23S rDNA byl u všech vzorků naamplifikován pomocí PCR primerů, sekvence tohoto genu se však nepodařilo získat ani z jednoho testovaného izolátu.

Všechny sekvence, které byly v rámci této diplomové práce zjištěny, byly zaslány do genové databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). V blízké době budou do této databáze zařazeny.

Použitá literatura

- Alma A, Bosco D, Danielli A, Bertaccini A, Vibio M, Arzone A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 2: 115-121.
- Bai XD, Zhang JH, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682-3696.
- Beandland L, Hoy CW, Miller SA, Nault LR. 1999: Leafhopper transmission of the aster yellows phytoplasma: Does sex matter? *Environmental Entomology* 28: 1101-1106.
- Bertaccini A. 2007: Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Bos L. 1999. Human interference with viruses. In: *Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology*. Pp 261-298. Backhuys Publishers, Leiden. ISBN 90-5782-012-9.
- Casati P, Quaglino F, Tedeschi R, Spiga FM, Alma A, Spadone P, Bianco PA. 2010. Identification and Molecular Characterization of 'Candidatus Phytoplasma mali' Isolates in North-western Italy. *Journal of Phytopatology* 158: 81-87.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1175-1184.
- Clark MF, Barbara DJ, Davies DL. 1986. Production and characteristic of antisera to *Spiroplasma citri* and clover phyllody associated antigens derived from plants. *Annals of Applied Biology* 103: 251-259.
- Contaldo N, Makarova O, Paltrinieri S, Bertaccini A, Nicolaisen M. 2010. QBOL – Identification of Phytoplasmas Using DNA Barcodes. In: Brown DR, Bertaccini A

(eds.) *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for Mycoplasmaology* (July 11-16, 2010), p. 54. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Cordova I, Jones P, Harrison NA, Oropeza C. 2003. *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology* 4: 99-108.

Cousin MT, Boudon-Padieu E. 2002. Phytoplasma and phytoplasma diseases: vectors, control, and research topics. *Cahiers Agricultures* 11: 115-125.

Čermáková H. 2009. Detekce a identifikace fytoplazem ve šlechtitelském materiálu hrušní. Bc. práce, PřF JU, Č. Budějovice, 35 str.

Davis RE, 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.

Deng S, Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.

Doi Y, Terenaka M, Yora K, Asuyama H. 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem element of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Annual meeting of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.

Fialová R. 2008. Interakce fytoplazem s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem. In: Navrátil M, Fialová R (eds.) *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. Pp. 26-33. Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností.

Fránová J, Paltrinieri S, Botti S, Šimková M, Bertaccini A. 2004. Association of Phytoplasmas and Viruses with Malformed Clovers. *Folia Microbiologica*. 49: 617-624.

Fránová J. 2008. Metody detekce fytoplazmových onemocnění. In: Navrátil M, Fialová R (eds.) *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. Pp. 34-43. Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností.

- Fránová J, Navrátil M, Jakešová H. 2009. Molecular Identification of Stolbur Phytoplasma Associated with Red Clover Dwarf Disease Symptoms. *Journal of Phytopatology* 157: 502-506.
- Galleto L, Bosco D, Marzachi C. 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology* 147: 191-201.
- Galleto L, Marzachi C. 2010. Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P (eds.) *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. MPG Books Group, AMA Dataset, Preston, UK. Pp 1-18. ISBN 978-1-84593-530-6.
- Gibb KS, Padovan AC, Mogen BD. 1995. Studies on sweet potato little leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85: 169 – 174.
- Gundersen DE, Lee I-M, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ, Davis RE, Kingsbury DT. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X diseases and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 64-75.
- Guo YH, Cheng Z-M, Walla JA. 2000. Amplification of the 23S rRNA gene and its application in differentiation and detection of phytoplasmas. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 380-386.
- Haggis GH, Sinha RC. 1978. Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology* 68: 677-80.
- Hibino H, Schneider H. 1970: Mycoplasma-like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathology* 60: 449-501.
- 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.

Hogenhout SA, Oshima K, Ammar E-D, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.

Hren M, Boben J, Rotter A, Kralj P, Gruden K, Ravnihar M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostic. *Plant Pathology* 56: 785-796.

Ishii T, Doi Y, Yora K, Asuyama H. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Annual Meeting of the Phytopathological Society in Japan* 33: 267-275

Ishii Y, Neriya Y, Sugawara K, Kojima N, Himeno M, Hoshi A, Kakizawa S, Oshima K, Namba S. 2010. Gradual Loss of the Plasmid from OY Phytoplasma, and Relationship between Insect-Transmissibility and Plasmids of Phytoplasma. In: *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for Mycoplasmaology* (July 11-16, 2010), p. 196. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Jarausch W, Saillard C, Dosba F, Bové J-M. 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2916–2923.

Jarausch W, Lansac M, Dosba F. 1999: Seasonal colonization pattern of European stone fruit phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology* 147: 47-54.

Jarausch W, Saillard C, Helliot B, Garnier M, Dosba F. 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes* 14: 17-24.

Khan AJ, Botti S, Paltrinieri S, Al-Subhi AM, Bertaccini A. 2002: Phytoplasmas in

alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: *Abstracts of 14th International Organization of Mycoplasma Conference, Vienna, Austria*, p. 148.

Križanac I, Mikec I, Budinščak Ž, Šeruga Musić M, Škorić D. 2010. Diversity of Phytoplasmas infecting Fruit Trees and Their Vectors in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117: 206-213.

Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R, Seemüller E. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* 9: 306.

Llauger R, Fabre S, Rodriguez M, Alonso M, Luis M, Peralta EL, Cueto JR, Dollet M. 2010. Revealing a Geographical Distribution of Several Strains of Coconut Lethal Yellowing Phytoplasmas Associated with Different Patterns of Dispersal in Cuba. In: Brown DR, Bertaccini A (eds.) *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for Mycoplasma* (July 11-16, 2010), p. 196. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Lebsky V, Poghosyan A, Silva-Rosales L. 2009. Application of scanning elektron microscopy for diagnosing phytoplasmas in single and mixed (virus-phytoplasma) infection in Papaya. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 70

Lee I-M, Davis RE, Chen T-A, Chiykowski LN, Fletcher J, Hiruki C, Schaff DA. 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82: 977-986.

Lee I-M, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.

Lee I-M, Gundersen DE, Hammond RW, Davis RE. 1994. Use of mycoplasma-like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566.

Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM. 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, Davis RE, Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.

Lee I-M, Martini M, Bittner KD, Dane RA, Black MC, Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93: 1368-1377.

Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bittner KD, Marcone C, Seemüller E. 2004. 'Candidatus phytoplasma Asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 54: 1037-1048.

Loi N, Ermacora P, Ferrini F, Carraro L, Osler R. 2002: Trasmissione sperimentale del fitoplasma degli scopazzi del melo da piante "recovered" e sintomatiche di melo. *Petria* 12: 373-374.

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

Martini M, Ermacora P, Falginella L, Loi N, Carraro L. 2006. Molecular Differentiation of 'Candidatus Phytoplasma mali' and Its Spreading in Friuli Venezia Giulia Region (North-East Italy). *Acta Horticulturae (ISHS)* 781: 395.

Mejia JF, Paltrinieri S, Rincon E, Galeano Vanegas NF, Gaitan A, Pardo JM, Alvarez E, Duduk B, Bertaccini A. 2010. Characterization of Phytoplasma Strains Associated with Coffee Crispiness and Nopal Cafetero Witches Broom in Columbia. In: Brown DR, Bertaccini A (eds.) *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for Mycoplasmaology* (July 11-16, 2010), p. 196. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Namba S. 2010. New Developments in Molecular Biological Research on Plant-Pathogenic Mollicutes: A Tiny Phytoplasma with a Reduced Genome Tricks a Giant Plant Industry. In: Brown DR, Bertaccini A (eds.) *Proceedings of 18th Congress of The*

International Organization for Mycoplasmaology (July 11-16, 2010), p. 65. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Navrátil M, Fialová R. 2008. *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností. 147 stran.

Nishigawa H, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Myiata S, Ugaki M, Namba S. 2002. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two opening reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298: 195-201.

Oshima K, Miyata S, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Furuki K, Yanazaki M, Suzuki S, Wei W, Kuboyama T, Ugaki M, Namba S. 2002. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellow phytoplasma. *Journal of General Plant Pathology* 68: 225-236.

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36: 27-29.

Padovan AC, Gibb KS, Bertaccini A, Vibio M, Bonfiglioli RE, Magarey PA, Sears BB. 1995. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows from Emilia-Romagna in Italy. *Australian Journal of Grape and vine Research* 1: 25-31.

Růžička T. 2008. Fytoplazmy jako karanténní patogeny. In: Navrátil M, Fialová R (eds.) *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. Pp. 44-61. Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností.

Schaff DA, Lee I-M, Davis RE. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 186: 1503-1509.

Schaper U, Seemüller E. 1984. Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline diseased trees by causal organisms in spring. *Zeitschrift für*

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 91: 608-613.

Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin R, Tully JG (eds.) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Pp. 369-380. San Diego: Academic Press.

Skrzeczkowski LJ, Howell WE, Eastwell KC, Cavileer TD. 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from ribosomal RNA operon. *Acta Horticulturae* 550: 417-424.

Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz K-H, Seemüller E, Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžicková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*. Pp. 59-110. Vydala Masarykova univerzita v Brně. ISBN 80-210-3841-1.

Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R, Gibb KS. 2008. Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190: 3979-3991.

Tsai JH. 1979. Vector transmission of mycoplasma agents of plant diseases. In: Whitcomb RF, Tully JG (eds.) *Plant and insect Mycoplasmas*, vol III. Pp. 265-307 Academic, New York.

Wei W, Davis RE, Lee I-M, Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.

Wei W, Wu W, Lee I-M, Davis RE, Owens RA, Nuss DL, Zhao Y. 2010. Development of Biomarkers and a Diagnostic Tool for Studying Mixed Infections by and Interactions between Potato Purple Top and Potato Witches'-Broom Phytoplasmas. In: Brown DR, Bertaccini A (eds.) *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for*

Mycoplasma (July 11-16, 2010), p. 208. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Wu W, Wei W, Davis RE, Lee I-M, Zhao Y. 2010. Salicylic Acid-Mediated Elicitation of Defense-Related Genes Enhances Tomato Resistance to Infection by Potato Purple Top Phytoplasma. *Proceedings of 18th Congress of The International Organization for Mycoplasma* (July 11-16, 2010), p. 81. Chianciano Terme, Siena, Italy.

Yoshiko I, Shigeyuki K, Ayaka H, Kensaku M, Satoshi K, Yasuyuki Y, Kenro O, Shigetou N. 2009. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology* 155: 2058–2067.

Přílohy

Příloha 1: *Předběžný výpis obdrženy z the GenBank; hrušeň č. 221/2010, gen secA*

Příloha 2: *Předběžný výpis z the GenBank; hrušeň č. 357/2010, gen 16S rRNA*

Příloha 3: *Výsledek porovnání sekvence genu 16S a přilehlé oblasti vzorku hrušně č. 357/2010 s nejpříbuznější sekvencí nalezenou v genové databázi NCBI pomocí vyhledavače BLAST*

Příloha 4: *Obrazová část*

Příloha 1: Předběžný výpis obdrženy z the GenBank; hrušeň č. 221/2010, gen secA

Preliminary GenBank flatfiles

The GenBank Submissions Staff
Bethesda, Maryland, USA

LOCUS Seq1 361 bp DNA linear BCT

18-APR-2011

DEFINITION Candidatus Phytoplasma pyri.

ACCESSION

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Candidatus Phytoplasma pyri

ORGANISM Candidatus Phytoplasma pyri

Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; 16SrX (Apple
proliferation group).

REFERENCE 1 (bases 1 to 361)

AUTHORS Cermakova,H. and Franova,J.

TITLE 1

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 361)

AUTHORS Cermakova,H. and Franova,J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-APR-2011) Plant Virology, BC ASCR v.v.i.

IPMB,

Branisovska 31, Ceske Budejovice, Czech Republic 370 05,

Czech

Republic

COMMENT Bankit Comment: LocalID:Seq1.

Bankit Comment: bankit1447960.

Bankit Comment: BankIt ID:1447960.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..361

/organism="Candidatus Phytoplasma pyri"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="221/2010"

/isolation_source="leaf midribs and phloem"

/host="Pyrus communis"

/db_xref="taxon:47566"

/country="Czech Republic"

```

/subgroup="16Sr X-C"
/note="extrachromosomal
[uncultured (with species-specific primers)]"
gene <1..>361
/gene="secA"
CDS <1..361
/gene="secA"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="secA"
```

BASE COUNT: 148 a 38 c 40 g 135 t

ORIGIN

```

1 tttaaaaaca atcatttata tttattgatt ttagaaaact aaaactattg aattaaccga
61 aaagggata aataaagcag aaaatTTTTT tcaaataaat aatttatata atattaatca
121 tgcacaatta ttacatcgta ttaagaatgc tttaaaagct ttttttttaa tgcataataa
181 caaagattat ttagttgtaa aagataaaat attgattatt gatgaattta caggtagaat
241 tttaaaaggc cgtcaattta gtaatggttt acatcaagct ttagaagcta aagaaagagt
301 tactattaaa cctgaaacta ctatttcagc cactattact tatcaaaatt tttttcgtct
361 t
```

Příloha 2: *Předběžný výpis z the GenBank; hrušeň č. 357/2010, gen 16S rRNA*

Preliminary GenBank flatfiles

The GenBank Submissions Staff
Bethesda, Maryland, USA

LOCUS Seq1 1574 bp rRNA linear BCT
06-APR-2011
DEFINITION Candidatus Phytoplasma pyri chromosome 16S rDNA and
16S/23S rDNA
 spacer region.
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE Candidatus Phytoplasma pyri
 ORGANISM Candidatus Phytoplasma pyri
 Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Acholeplasmatales;
 Acholeplasmataceae; Candidatus Phytoplasma; 16SrX (Apple
 proliferation group).
REFERENCE 1 (bases 1 to 1574)
 AUTHORS Franova, J. and Cermakova, H.
 TITLE Candidatus Phytoplasma pyri 16S rRNA gene, tRNA-Ile gene
 JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1574)
 AUTHORS Franova, J. and Cermakova, H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-APR-2011) Plant Virology, BC ASCR v.v.i.
IPMB,
 Branisovska 31, Ceske Budejovice, Czech Republic 370 05,
Czech
 Republic
COMMENT Bankit Comment: bankit1445510.
 Bankit Comment: BankIt ID:1445510.
 Bankit Comment: LocalID:Seq1.
FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1574
 /organism="Candidatus Phytoplasma pyri"
 /mol_type="rRNA"
 /isolation_source="Pyrus communis"
 /host="Pyrus communis"
 /db_xref="taxon:47566"
 /chromosome="16S rDNA and 16S/23S rDNA spacer
region"
 /country="Czech Republic"
 /subgroup="16Sr X-C"
 /note="[uncultured (with species-specific
primers)]"
 rRNA <1..1392
 /gene="16S rRNA"
 /product="16S ribosomal RNA"
 misc_RNA 1393..1463
 /product="intergenic spacer, IGS"
 tRNA 1464..1540
 /gene="tRNA-Ile"
 /product="tRNA-Ile"
 misc_RNA 1541..>1574
 /product="intergenic spacer, IGS"
BASE COUNT 476 a 282 c 417 g 399 t

ORIGIN

1 cagttggaaa cgactgctaa gactggatag gaagttttaa ggcaccttga aactttttaa
 61 agaccgcaa gggatgctg agagatgggc ttgcggcaca ttagttagtt ggtaaggtaa
 121 cggcttacca agaccatgat gtgtagctgg actgagaggt tgaacggcca cattgggact
 181 gagatacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaagga attttcggca atggaggaaa
 241 ctctgaccga gcaacgccgc gtgaacgatg aagtathtag gtatgtaaag ttcttttatt
 301 aaagaagaaa aatgatgga aaaatcattc tgacggattt taatgaataa gccccggcta
 361 actatgtgcc agcagctgcg gtaatacatg gggggcaagc gttatccgga tttattgggc
 421 gtaaaggggtg cgtaggcggg ttaataagtc tatggctctaa gttcaacgct taacgttgtg
 481 atgctataga aactgtttga ctagagttgg atagaggcaa gtggaattcc atgtgtagcg
 541 gtaaaatgcg taaagatatg gaggaacacc agtagcgaag gcggcttctt gggcttaac
 601 tgacgctgag gcacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgt tagtccacgc
 661 cgtaaacgat gagtactaag tgttgggtta aaccagtgct gaagttaacg cattaagtac
 721 tccgcctgag tagtacgtac gcaagtatga aacttaaagg aattgacggg actccgcaca
 781 agcgggtgat catgttgttt aattcgaaga tacacgaaaa accttaccag gtcttgacat
 841 actctgcaaa gctatagaaa tatagtggag gttatcaggg atacaggtgg tgcattggtg
 901 tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcga cccttatcgc
 961 tagttaccat catttagttg ggcactttag tgagactgcc aatgataaat tggaggaagg
 1021 tggggattac gtcaaactat catgcccctt atgacctggg ctacaaactg gatacaatgg
 1081 ctgttacaaa gagtagctga agcgtgagtt ttagcaaat ctcaaaaaaa cagtctcagt
 1141 tcggattgaa gtctgcaact cgacttcatg aagtcggaat cgctagtaat cgcgaaatcag
 1201 catgtcgtgg tgaatacgtt ctccggggtt gtacacaccg cccgtcaaac catgaaagt
 1261 gacaataccc gaaaccagta gcctaacttg caaaagaggg aactgtctaa ggtaggggtg
 1321 atgattgggg ttaagtcgta acaaggatc cctaccggaa ggtggggatg gatcacctcc
 1381 tttctaagga aaatatcatc ttcagttgtg aaagacttaa aaaaaagttt tttatttttt
 1441 aagataaaaa ttaataatgg ccggggccta tagctcagtt ggtagagca cacgcctgat
 1501 aagcgtgagg tcgatggttc gagtccattt aggccacca aaatatttat tttaaaaaaa
 1561 agctctttga aaag

Příloha 3: Výsledek porovnání sekvence genu 16S a přilehlé oblasti vzorku hrušně č. 357/2010 s nejpříbuznější sekvencí nalezenou v genové databázi NCBI pomocí vyhledavače BLASTu

>[emb|AJ542543.1](#) Candidatus Phytoplasma pyri 16S rRNA gene, tRNA-Ile gene and 23S rRNA gene (partial), strain PD1
Length=1785

Score = 2902 bits (1571), Expect = 0.0
Identities = 1574/1575 (99%), Gaps = 1/1575 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query    1  CAGTTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAACCTTTTAAAAA 60
      |||
Sbjct  130 CAGTTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAACCTTTTAAAAA 189

Query    61  AGACCCGCAAGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAAGGTAA 120
      |||
Sbjct   190  AGACCCGCAAGGGTATGCTGAGAGATGGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAAGGTAA 249

Query   121  CGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACT 180
      |||
Sbjct   250  CGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACT 309

Query   181  GAGATACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGCAATGGAGGAAA 240
      |||
Sbjct   310  GAGATACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGCAATGGAGGAAA 369

Query   241  CTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAAAGTTCTTTTATT 300
      |||
Sbjct   370  CTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAAAGTTCTTTTATT 429

Query   301  AAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAGCCCCGGCTA 360
      |||
Sbjct   430  AAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAGCCCCGGCTA 489

Query   361  ACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGC 420
      |||
Sbjct   490  ACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGC 549

Query   421  GTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCTTAACGTTGTG 480
      |||
Sbjct   550  GTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCTTAACGTTGTG 609

Query   481  ATGCTATAGAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGCG 540
      |||
Sbjct   610  ATGCTATAGAACTGTTTGACTAGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGCG 669

Query   541  GTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAC 600
      |||
Sbjct   670  GTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAAC 729

Query   601  TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC 660
      |||
Sbjct   730  TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC 789

Query   661  CGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGTAC 720
      |||
Sbjct   790  CGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGTAC 849

```

```

Query 721  TCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA 780
           |||
Sbjct 850  TCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACA 909

Query 781  AGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACAT 840
           |||
Sbjct 910  AGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACAT 969

Query 841  ACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTG 900
           |||
Sbjct 970  ACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTG 1029

Query 901  TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCGC 960
           |||
Sbjct 1030 TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCGC 1089

Query 961  TAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACCTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGG 1020
           |||
Sbjct 1090 TAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACCTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGG 1149

Query 1021  TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGG 1080
           |||
Sbjct 1150  TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGG 1209

Query 1081  CTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGTGAGTTTTTAGCAAATCTCaaaaaaaaCAGTCTCAGT 1140
           |||
Sbjct 1210  CTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGTGAGTTTTTAGCAAATCTCAAAAAAAAACAGTCTCAGT 1269

Query 1141  TCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1200
           |||
Sbjct 1270  TCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1329

Query 1201  CATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAACCATGAAAGTT 1260
           |||
Sbjct 1330  CATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAACCATGAAAGTT 1389

Query 1261  GACAATACCCGAAACCAGTAGCCTAACTTGCAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTTG 1320
           |||
Sbjct 1390  GACAATACCCGAAACCAGTAGCCTAACTTGCAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTTG 1449

Query 1321  ATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGAAGGTGGGGATGGATCACCTCC 1380
           |||
Sbjct 1450  ATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGAAGGTGGGGATGGATCACCTCC 1509

Query 1381  TTTCTAAGGAAAATATCATCTTCAGTTGTGAAAGACTTaaaaaaaaGttttttatTTTT 1440
           |||
Sbjct 1510  TTTCTAAGGAAAATATCATCTTCAGTTGTGAAAGACTTAAAAAAAAAGTTTTTTATTTTT 1569

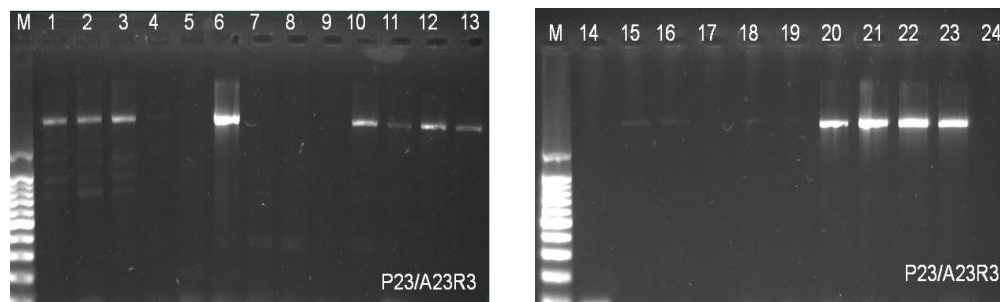
Query 1441  AAGATAAAAATTAATAATGGCCGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCTGAT 1500
           |||
Sbjct 1570  AAGATAAAAATTAATAATGGCCGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCTGAT 1629

Query 1501  AAGCGTGAGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAA■TATTTATTTTaaaaaa 1559
           |||
Sbjct 1630  AAGCGTGAGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAAATATTTATTTTAAAAAA 1689

Query 1560  aaGCTCTTTGAAAAG 1574
           |||
Sbjct 1690  AAGCTCTTTGAAAAG 1704

```

Příloha 4: *Obrazová část*

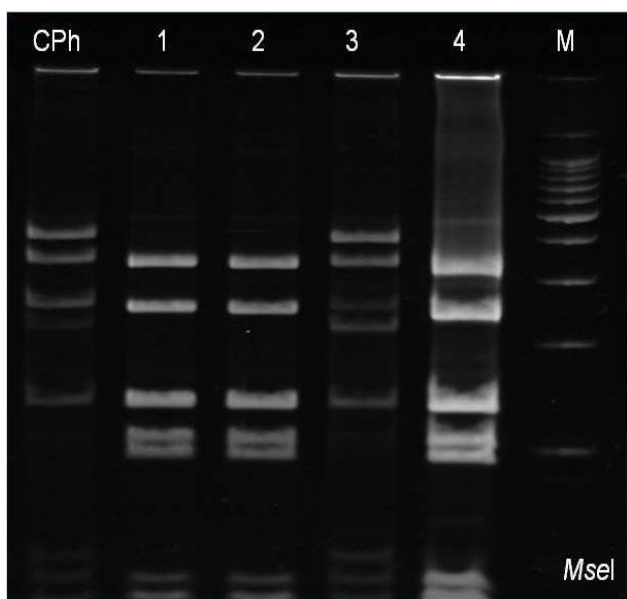


Obr. 1: Polymerázová řetězová reakce (PCR) vybraných izolátů. Direct PCR s primery P23/A23R3. Fragmenty byly separovány horizontální elektroforézou v agarózovém gelu.

Vysvětlivky k obr. 1:

M – 100 pb marker (velikost fragmentů odshora směrem dolů: 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50)

| <u>č. vzorku</u> | <u>název vzorku</u> |
|------------------|---------------------------|
| 1, 2, 3, 4 | vinka II/6 |
| 5 | voda (negativní kontrola) |
| 6, 7, 8 | jabloň 137/2010 |
| 9 | voda |
| 10, 11, 12, 13 | hrušeň 357/2010 |
| 14 | voda |
| 15, 16, 17, 18 | meruňka 143/2010 |
| 19 | voda |
| 20, 21, 22, 23 | hrušeň 221/2010 |
| 24 | voda |



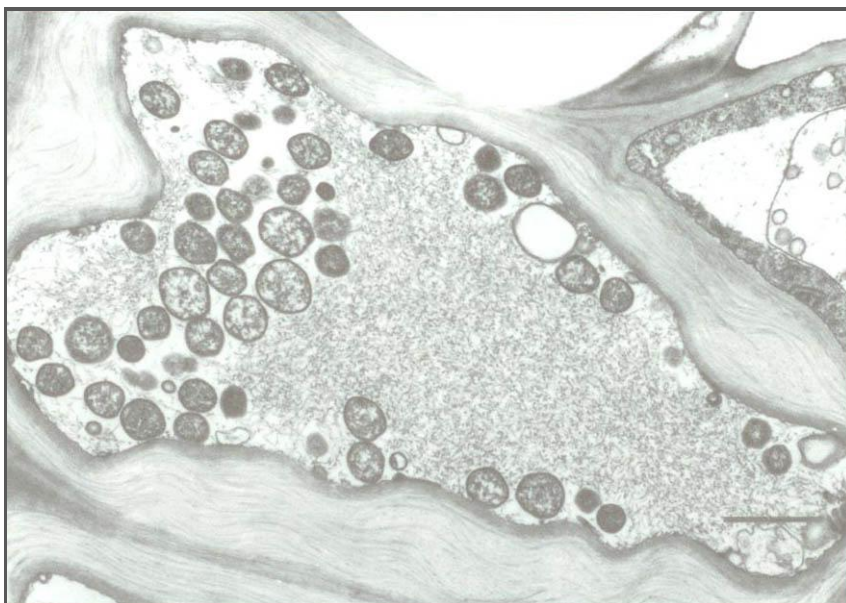
Obr. 2: Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) 16Sr DNA izolátů fytoplazem po amplifikaci primery F2n/R2. Štěpení enzymem *MseI*. Fragменты byly separovány vertikální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu.

Vysvětlivky k obr. 2:

| <u>č. vzorku</u> | <u>název vzorku</u> |
|------------------|-------------------------------------|
| CPh | clover phyllody; pozitivní kontrola |
| 1 | jabloň 137/2010 |
| 2 | hrušeň 357/2010 |
| 3 | vinka II/6 |
| 4 | meruňka 143/2010 |
| M | 100 pb marker (vizte obr. 1) |



Obr. 3: Plody meruňky (*Prunus armericana*) odrůdy 'Hatif Colomer' infikované fytoplazmou ESFY (vpravo), ve srovnání s plody zdravého stromu (vlevo). Převzato z Navrátil a Fialová, 2008. Foto Tomáš Nečas.



Obr. 4: Fytoplazmové částice v rostlinné buňce. Snímek z elektronového mikroskopu.
Foto Jana Fránová.



Obr. 5: Zdravá rostlina barvínku růžového (*Catharanthus roseus*) (vlevo) a detailní snímek květu barvínku infikovaného fytoplazmou clover phyllody (vpravo). Na infikované rostlině je patrná zelenokvětost a zřetelná deformace květních orgánů (prodloužení kališních lístků). Foto Jana Fránová.