

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Laboratoř růstových regulátorů



**Molekulárně biologická charakteristika fytoplazmy stolburu
(*Ca. Phytoplasma solani*)**

Bakalářská práce

Veronika Věšková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: prezenční

OLOMOUC 2013

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

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Veronika Věnsková

Název práce: Molekulárně biologická charakteristika fytoplazmy stolburu (*Ca. Phytoplasma solani*)

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů

Vedoucí: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D

Rok obhajoby práce : 2013

Abstrakt: Bakalářská práce se věnuje molekulárně-biologické charakterizaci fytoplazmy stolburu. V teoretické části je nejdříve definován pojem fytoplazma, následně se zabývá konkrétním vymezením problematiky fytoplazmy stolburu a její molekulárně genetické variability. Experimentální část se zabývá detekcí a charakteristikou izolátů fytoplazmy stolburu původem z *Dicranotropis hamata* a *Hyalesthes obsoletus*, a to na úrovni 16S rRNA genu a neribozomálních genů *Tuf*, *Sec-Y* a *vmp1*. U *Dicranotropis hamata* byla fytoplazma detekována ve 22 % jedinců, v šesti případech se jednalo o fytoplazmu stolburu, v jednom případě fytoplazmu žloutenky aster. Všechny izoláty fytoplazmy stolburu příslušely k Tuf-b genotypu. Analýzou genetické variability neribozomálních genů *SecY* a *vmp1* nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve variabilitě izolátů stolburu pocházejících z *Dicranotropis hamata* a *Hyalesthes obsoletus*.

Klíčová slova: stolbur, *vmp1*, *tuf*, *sec-Y* geny, nested PCR, RFLP, sekvencování

Počet stran: 56

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Veronika Věnsková

Title of thesis: Molecular characterisation of stolbur phytoplasma (*Ca. Phytoplasma solani*)

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D

The year of presentation: 2013

Abstract: This bachelor's thesis deals with the molecular and biological characterization of stolbur phytoplasma. In the theoretical part, first the term phytoplasma is defined, then it deals with the specific definition of stolbur phytoplasma and its genetic variability. The experimental part deals with detection and characterization of stolbur phytoplasma isolates originating from *Dicranotropis hamata* and *Hyalesthes obsoletus*, at the level of the 16S rRNA gene and nonribosomal genes *Tuf*, *Sec-Y* and *vmp1*. At *Dicranotropis hamata* phytoplasma was detected in 22% individuals, in six cases it was stolbur phytoplasma, in one case aster yellows phytoplasma. All isolates of stolbur phytoplasma were classified as genotype Tuf-b. The analysis of genetic variability of the nonribosomal genes *Sec-Y* and *vmp1* showed no significant differences in variability between the isolates originating from *Dicranotropis hamata* and those from *Hyalesthes obsoletus*.

Keywords: stolbur disease, *vmp1*, *tuf*, *sec-Y* genes, nested PCR, RFLP, sequencing

Number of page: 56

Language: Czech

Na tomto místě bych ráda poděkovala, Mgr. Martinovi Starému a p. Janě Veselské za pomoc a cenné rady při práci v laboratoři a především vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Daně Šafářové, Ph.D., za trpělivost, poskytování užitečných informací a vstřícný přístup během konzultací a v průběhu zpracovávání práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Molekulárně biologická charakteristika fytoplazmy stolburu (*Ca. Phytoplasma solani*)“ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. na Katedře buněčné biologie a genetiky PřF UP Olomouc a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

.....

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. CÍLE PRÁCE.....	9
2. ÚVOD.....	10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Obecná charakteristika fytoplazem.....	11
3.2 Metody detekce a identifikace fytoplazem	12
3.2.1 Detekce založená na elektronové a fluorescenční mikroskopii.....	12
3.2.2 Detekce založená na imunochemických a hybridizačních metodách.....	12
3.2.3 Detekce založená na molekulárních metodách.....	13
3.2.3.1 PCR.....	13
3.2.3.2 RFLP.....	13
3.2.3.3 Sekvencování	14
3.3 Klasifikace fytoplazem	14
3.4 Taxonomie fytoplazem	15
3.5 Fytoplazma stolburu	16
3.5.1 Klasifikace fytoplazmy stolburu.....	16
3.5.2 Geografická rozšíření fytoplazmy stolburu	16
3.5.3 Hostitelé fytoplazmy stolburu	16
3.5.4 Příznaky stolburové infekce	17
3.5.5 Vektoři fytoplazmy stolburu.....	18
3.6 Genetická variabilita stolburu	19
3.6.1 Gen 16S rRNA	19
3.6.2 Gen <i>Tuf</i>	20
3.6.3 Gen <i>vmp1</i>	21
3.6.4 <i>Sec-Y</i> gen	22
3.7 Fytoplazma stolburu v České republice.....	22

4. MATERIÁL A METODY	25
4.1 Materiál	25
4.2 Metody	25
4.2.1 Izolace celkové DNA	25
4.2.2 PCR amplifikace.....	26
4.2.2.1 Nested PCR.....	27
4.2.3 Gelová elektroforéza	30
4.2.4 RFLP analýza	31
4.2.5 Sekvencování.....	32
4.2.5.1 Izolace PCR produktu z gelu	32
4.2.5.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace	33
4.2.5.3 Sekvenační značení.....	33
4.2.5.4 Analýza sekvencí	35
4.3 Přístrojové vybavení, použité roztoky a chemikálie	36
4.3.1 Přístrojové vybavení.....	36
4.3.2 Použité chemikálie a roztoky.....	36
5. VÝSLEDKY	38
6. DISKUZE	49
7. ZÁVĚR	51
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

16S rDNA	oblast na DNA, kódující 16S rRNA protein
16S rRNA	ribozomální RNA se sedimentačním koeficientem 16S
BN	Bois noir
bp	páry bází (base pairs)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
FD	Flavescence dorée
GY	žloutenka révy vinné (grapevine yellows)
IRPCM	International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology
kb	kilobáze (kilobase)
LN	Legno nero
MLOs	organismy podobné mykoplazmatům (mycoplasma-like organisms)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rpm	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
TAE	Tris-acetátový EDTA pufr (Tris acetate EDTA buffer)
TBE	Tris-borátový EDTA pufr (Tris borate EDTA buffer)
VK	Vergilbungskrankheit

1. CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce je:

1. Shromáždit literaturu a vypracovat literární rešerši na téma molekulárně biologická charakteristika izolátů fytoplazmy stolburu.
2. Izolovat DNA a detekovat izoláty fytoplazmy stolburu ve vektorech *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) a *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865).
3. Molekulárně charakterizovat izoláty stolburu na základě ribozomálních a neribozomálních genů (16S rRNA, *vmpI*, *sec-Y*, *Tuf*).

2. ÚVOD

Fytoplazmy jsou prokaryotické organismy, patřící do třídy *Mollicutes* (třída bakterií), s dřívějším označením mycoplasma-like organisms (MLOs). Napadají celou škálu rostlinných druhů od ovocných dřevin, planě rostoucích bylin, až po zemědělské plodiny, na kterých způsobují značné ekonomické ztráty.

Tyto rostlinné fytopatogeny obsahují jednu vrstvu plazmatické membrány a postrádají buněčnou stěnu. Svojí vysokou specializací a nekultivovatelností v podmínkách *in vitro* se podobají virům. Jsou to kulovité, pleomorfní buňky, vyplněné ribozomy a DNA. Vyskytují se především ve floémové šťávě rostlin a v těle hmyzích vektorů (křísi, mery, ploštice).

Významným zástupcem fytoplazem je fytoplazma stolburu, mající silný ekonomický vliv na vinařské oblasti ve Francii a v jiných evropských zemích, kde způsobuje chorobu označovanou jako Bois noir. Na infikované révě vinné jsou pozorovatelné typické příznaky infekce například redukce růstu, žloutnutí nebo červení listů, malformace květních částí, svinutí listů. Podobné příznaky se vyskytují i u dalších hostitelských plodin z čeledi *Solanaceae* jako jsou například lilek, rajče, paprika. Tato fytoplazma je přenášena žilnatkou vironosnou (*Hyalesthes obsoletus*, Signoret, 1865).

Uvedená práce se zabývá detekcí a molekulárně biologickou charakterizací fytoplazmy stolburu v *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) a *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865). Detekce fytoplazem byla provedena na základě PCR amplifikace. U vybraných pozitivních izolátů byla provedena molekulárně genetická charakterizace ribozomálních a neribozomálních genů (16S rRNA, *vmp1*, *sec-Y*, *Tuf*).

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Obecná charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou patogenní organismy nacházející se ve floému sítkovic řady rostlin. Jsou to prokaryotní organismy s chybějící buněčnou stěnou. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 200 – 800 nm (Bertaccini, 2007).

Původně se myslelo, že tyto nitrobuněční parazité patří mezi viry (Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000). Až v 60. letech minulého století byla tato domněnka vyvrácena skupinou japonských vědců (Doi *et al.*, 1967), kteří pomocí elektronové mikroskopie pozorovali floém astry vykazující typické příznaky infekce a objevili oválné buňky bez buněčné stěny, které považovali za původce žloutenky aster. Struktury se morfologicky podobaly lidským a zvířecím patogenům třídy *Mollicutes*, mykoplazmám, a proto je označili jako 'mycoplasma-like organisms' (MLOs) (Lee *et al.*, 1998a; Seemüller *et al.*, 1998). Název MLOs přetrval až do roku 1992, kdy byl na 9. kongresu Mezinárodní organizace pro mykoplazmologii nahrazen triviálním termínem fytoplazma. O 2 roky později bylo týmem IRPCM oficiálně přijato označení '*Candidatus* Phytoplasma' (Firrao, 2004).

V dalších letech se vědci snažily tyto organismy kultivovat *in vitro*. Pokusy byly neúspěšné a bránily tak detailnímu určení fylogenetických a taxonomických vztahů fytoplazem mezi sebou navzájem a s dalšími prokaryoty. Až s vývojem molekulárních metod mohla být tato oblast detailněji prozkoumána. Důležitým, ve studiu detekce a klasifikace, byla oblast genu 16S rRNA (Schneider *et al.*, 1997).

Fytoplazmy se vyskytují po celém světě, kde způsobují řadu rostlinných chorob. Některé kmeny fytoplazem jsou spojeny s těžkými epidemiemi a řada z nich se řadí mezi karanténní organismy. Rostliny napadené fytoplazmami vykazují řadu příznaků jako je například sterilita květů, virescence, zmnožení vrcholových (axilárních) pupenů (metlovitost), prodlužování internodií, redukovaný růst (Bertaccini, 2007).

Šíření fytoplazem je nejčastěji uskutečňováno prostřednictvím hmyzu. Především se jedná o hmyzí vektory z čeledi žilnatkovití (*Cixiidae*) a merovití (*Psyllidae*) (Bertaccini, 2007). Tito živočichové se živí sáním asimilátů z rostlinných sítkovic, odkud se mohou fytoplazmy dostat až do trávicího traktu či slinných žláz těchto hostitelů a sáním na dalších rostlinách jsou pak přenášeny.

3.2 Metody detekce a identifikace fytoplazem

V minulosti nebyla detekce a identifikace kvůli neschopnosti kultivovat fytoplazmy v čistých kulturách příliš jednoduchá. Zpočátku se nahlíželo pouze na biologické charakteristiky a to především na změny vzhledu rostlin, a zda se objevují typické příznaky infekce. Dalším kritériem byla přítomnost specifického hmyzího hostitele a zeměpisná oblast. Hodnocení těchto kritérií bylo příliš složité, časově náročné, subjektivní a proto rozporuplné (Lee *et al.*, 2000; Seemüller *et al.*, 1998).

3.2.1 Detekce založená na elektronové a fluorescenční mikroskopii

Fytoplazmy je možno detekovat mikroskopicky, pomocí elektronové nebo fluorescenční mikroskopie. Tyto metody byly prováděny hlavně v minulých letech.

Pomocí elektronové mikroskopie je možné rozlišit fytoplazmy ve floému rostlin pouze, pokud se v hostiteli nacházejí ve vysoké koncentraci. Pomocí této metody je možné detekovat přítomnost, lokalizovat a popřípadě určit tvar a velikost fytoplazem. Nevýhodou je, že pomocí elektronové mikroskopie je mnohdy těžké rozlišit fytoplazmy od jiných buněčných struktur. Navíc je příprava vzorků u této metody časově náročná a velice pracná. Citlivější metodou detekce je fluorescenční barvení pomocí DNA fluorochromu DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), který zobrazuje fytoplazmy jako modro-bílé body. Nevýhodou této techniky je limitace v detekci, která je způsobená nízkou populační koncentrací, především u dřevin. Výhodou této metody je rychlost a nízké provozní náklady (Ahrens *et Seemüller*, 1992; Bertaccini, 2007).

3.2.2 Detekce založená na imunochemických a hybridizačních metodách

Vývoj DNA sond nastartoval diferenciaci mezi jednotlivými skupinami fytoplazem pomocí molekulárních metod, jako jsou DOT hybridizace a Southern hybridizace. Sondy, klonované fragmenty chromozomální DNA fytoplazem, používané v těchto metodách vykazují širší detekční rozsah než protilátky. Mají omezenou velikost a jsou různě specifické. Nevýhodou hybridizačních metod je malá citlivost sond vzhledem k nízké koncentraci fytoplazem (Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000).

Kromě sond se také rozvíjelo využití monoklonálních a polyklonálních protilátek. Díky vysoce specifickým monoklonálním protilátkám se zlepšila spolehlivost detekce fytoplazem pomocí ELISA testu a imunofluorescenční mikroskopie (Lee *et al.*, 1998a, 2000, Bertaccini *et al.*, 2007). ELISA test se pro detekci využívá jen velmi

zřídka, jelikož není pro jeho uskutečnění vyrobeno dostatek specifických a vysoce koncentrovaných protilátek. Často také vyrobené protilátky, pocházející z těl rostlin a hmyzu, vykazují křížové reakce (Seemüller *et al.*, 1998).

3.2.3 Detekce založená na molekulárních metodách

S rozvojem molekulární biologie, se stávaly přístupy pro detekci a identifikaci fytoplazem čím dál dokonalejší a umožnily velký pokrok v diagnostice chorob způsobených těmito fytopatogeny (Lee *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000). Kvůli novým, citlivějším a specifitějším molekulárním metodám bylo usnadněno studium zabývající se diverzitou a ekologií fytoplazem (Lee *et al.*, 1998a).

3.2.3.1 PCR

V současnosti nejčastější a nejcitlivější metodou používanou pro detekci fytoplazem je nested PCR, která je vhodná pro diagnostiku různých chorob. Výhodou této techniky, na rozdíl od sérologických a hybridizačních testů, je detekce fytoplazem i ve velmi nízkých koncentracích (Ahrens *et Seemüller*, 1992; Lee *et al.*, 2000).

Univerzální detekce a identifikace fytoplazem je založená na amplifikaci 16S rRNA genu za pomoci univerzálních primerů P1/P7 a R16F2/R2, která poskytuje produkt dlouhý přibližně 1200 bp (Deng *et Hiruki*, 1991; Schneider *et al.*, 1995).

Existují také detekce využívající specifické primery. Tento přístup je však vhodný pro konkrétní druhy fytoplazem. Amplifikace se provádí u genů ležících mimo ribozomální oblast.

3.2.3.2 RFLP

Metoda, která odlišuje jednotlivé izoláty fytoplazem, se označuje jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism, RFLP). Tato analýza probíhá za pomoci restrikčních endonukleáz, které štěpí amplifikovanou DNA na specifických restrikčních místech (často palindromové sekvence). Existuje celá řada těchto bakteriálních enzymů, které štěpí amplifikovanou DNA na menší fragmenty, mezi nejčastěji používané patří *RsaI*, *MseI*, *AluI*, *HpaII*, *TaqI*, *HinfI* a další. Rozdíly lze pozorovat v délce a počtu těchto fragmentů pomocí UV transluminátoru po předchozí elektroforetické separaci. Podobné fytoplazmy vykazují podobné profily, kdežto fytoplazmy pocházející z různých hmyzích vektorů nebo zeměpisných oblastí se

v RFLP profilech liší (Seemüller *et al.*, 1998). Pro lepší rozlišení druhů se k analýzám používá větší počet restričních enzymů (Lee *et al.*, 1993). Výsledné profily lze porovnat s databází virtuálních profilů, případně je možné provádět i RFLP analýzu *in silico* (Wei *et al.*, 2007).

3.2.3.3 Sekvencování

Další významnou metodou používající se k detekci fytoplazem je sekvencování. Tato metoda využívá různých ribozomálních či neribozomálních genů. Výsledné sekvence jsou posléze srovnávány s databází (GenBank) nebo mohou být virtuálně štěpeny. Tato metoda, umožňující vzájemné porovnání sekvencí a fylogenetickou analýzu, slouží jako základ pro přesnější taxonomii, především v třídě *Mollicutes* (Bertaccini, 2007).

Klasifikace a taxonomie fytoplazem byla kvůli nedostupnosti fenotypových informací založena především na molekulární analýze genu 16S rRNA, který byl vhodný pro tuto charakterizaci (Lee *et al.*, 2000). S cílem rozšířit účinnost a kapacitu stávajícího genu 16S rRNA vyvinuli Zhao *et al.* (2009) program iPhyClassifier. Ten provádí sekvenční podobnostní analýzu ve srovnání s referenčními izoláty fytoplazem a simuluje restriční štípání různými restričními enzymy a gelovou elektroforézou a následně vytváří virtuální RFLP profily. Pomocí tohoto programu je možné zařadit fytoplazmy do konkrétních druhů 'Candidatus phytoplasma'.

3.3 Klasifikace fytoplazem

Za řadu let, kdy jsou fytoplazmy studovány, bylo navrženo několik klasifikačních systémů, které se postupem času rozšiřovaly a upřesňovaly. Klasifikační systémy vznikaly nejdříve na základě PCR/RFLP analýzy, později na základě analýzy vlastních sekvencí a jejich fylogenetických vztahů (Lee *et al.*, 1998b).

Lee *et al.* (1993) navrhli identifikaci a klasifikaci fytoplazem založenou na RFLP analýze 16S rDNA sekvence. Návrhu předcházelo testování 40 vzorků pocházejících z odlišných druhů infikovaných rostlin. RFLP analýze předcházela PCR amplifikace s použitím univerzálních primerů. Porovnáním výsledných RFLP profilů, na základě podobnostního koeficientu, bylo 40 zkoumaných MLOs klasifikováno do 9 skupin a 14 podskupin.

O pět let později Lee *et al.* (1998b) studovali soubor 34 izolátů fytoplazem a na RFLP analýzu použili 17 restričních endonukleáz a klasifikační schéma rozšířili na 14

hlavních skupin a 32 podskupin. Větší diverzita byla odhalena u 57 fytoplazem ve studii Seemülera *et al.* (1998). Díky této práci se klasifikační schéma rozrostlo o dalších 6 skupin.

Wei *et al.* (2007) prováděli *in silico* RFLP analýzu 16S rRNA genu fytoplazem. Analyzováno bylo celkem 524 fytoplazem, které byly štěpeny 17 různými restrikčními enzymy. Na základě zjištěných RFLP profilů pak navrhli v současnosti konečných 28 skupin fytoplazem.

Aby se rozšířily informace nejen o klasifikaci, ale také o molekulární variabilitě fytoplazem, začaly být studovány i další geny. Jedním z dalších byly např. geny *Tuf* a *vmp1* (Schneider *et al.*, 1997; Cimerman *et al.*, 2009).

3.4 Taxonomie fytoplazem

Kultivovat fytoplazmy v podmínkách *in vitro* se dosud nikomu nepodařilo. Tato skutečnost naznačuje odlišný metabolismus a výrazně redukovaný genom fytoplazem ve srovnání s ostatními prokaryoty z třídy *Mollicutes* (Bai *et al.*, 2006).

Tato skutečnost znemožňuje určení jejich taxonomického statusu pomocí klasických přístupů integrace informací o fenotypu, genotypu a fylogenezi, které se tradičně používají v moderní bakteriální taxonomii u kultivovatelných prokaryot (Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Na základě analýzy 16S rDNA sekvence bylo zjištěno, že fytoplazmy představují monofyletickou větev v rámci třídy *Mollicutes* (Lee *et al.*, 2000). Třída *Mollicutes* se skládá ze dvou větví, do první spadá řád *Acholeplasmatales* a *Anaeroplasmatales* a další. Druhá větev obsahuje *Mycoplasmatales* a *Entoplasmatales* (Bai *et al.*, 2006). Fytoplazmy jsou příbuznější *Acholeplasmatales* než *Mycoplasmatales*, a za nejbližší příbuzné fytoplazem byly označeny *Acholeplasma* – *A. palmae* a *A. modicum* (Lee *et al.*, 2000). Klasifikace fytoplazem, které tvoří parafyletickou skupinu, do druhů označovaných jako 'Candidatus Phytoplasma' se děje na základě klasifikačních pravidel zveřejněných IRPCM v roce 2000 (Firrao, 2004). Fytoplazma je charakterizována jedinečnou sekvencí 16Sr RNA genu CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT. Aby byl izolát označen jako samostatný druh, 'Ca. Phytoplasma', musí vykazovat podobnost se sekvencí 16Sr DNA nižší než 97,5 %. Fytoplazmy s vyšší homologií v této sekvenci se mohou stát samostatnými druhy, pokud splňují další biologické charakteristiky - jedná

se o ekologicky oddělenou populaci, jsou přenášeny odlišnými vektory, liší se rostlinnými hostiteli a existují důkazy o jejich genetické diverzitě (Firrao, 2004).

3.5 Fytoplazma stolburu

3.5.1 Klasifikace fytoplazmy stolburu

Fytoplazma stolburu byla zařazena do skupiny 16SrXII podle klasifikačního schématu navrženého Lee *et al.* v roce 1998. Stolburová skupina byla dále rozdělena do 2 podskupin (A, B). Tento systém podskupin byl na základě simulované RFLP analýzy, brzy obohacen o další 3 podskupiny (C, D, E) (Wei *et al.*, 2007). Quaglino *et al.* (2009) pak toto schéma rozšířili o další 2 podskupiny G a F. Přes všechna nová rozšiřování se neměnilo nic na tom, že fytoplazma stolburu s neoficiálním názvem, navrženým IRPCM v r. 2004, '*Candidatus* Phytoplasma solani' (Firrao, 2004) patří do podskupiny 16SrXII-A (Lee *et al.*, 1998b).

3.5.2 Geografická rozšíření fytoplazmy stolburu

Výskyt fytoplazmy stolburu je nejčastěji spojován se zeměmi pěstující vinnou révu. Jedná se především o Francii, kde je tato choroba označována jako Bois Noir (BN), dále o Německo s označením Vergilbungskrankheit (VK) a v Itálii, kde se setkáme s pojmem Legno Nero (LN) (Quaglino *et al.*, 2009). Fytoplazma stolburu se kromě těchto hlavních oblastí vyskytuje také ve Španělsku (Battle *et al.*, 2000), Rakousku (Riedle-Bauer *et al.*, 2006), Bulharsku (Avramov *et al.*, 2008; Avramov *et al.*, 2011), České republice (Fialová *et al.*, 2009) a Chorvatsku (Music *et al.*, 2011). Kromě evropských zemí byla identifikována i v Severní Americe (Seemüller *et al.*, 1998).

3.5.3 Hostitelé fytoplazmy stolburu

Mezi primární hostitele patří planě rostoucí rostliny, jako jsou svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*), opletník plotní (*Calystegia sepium*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) nebo levandule (*Lavendula* sp.) (Langer *et Maixner*, 2004; Mori *et al.*, 2007; Riedle-Bauer *et al.*, 2008, Cimerman *et al.*, 2009; Fialová *et al.*, 2009; Navrátil *et al.*, 2009).

Z hospodářsky významných plodin napadá fytoplazma stolburu zástupce z čeledi *Solanaceae* (lilkovité) a *Apiaceae* (miříkovité), především lilek rajče (*Solanum lycopersicum*), miřík celer (*Apium graveolens*), lilek vejcoplodý (*Solanum melongena*),

paprika roční (*Capsicum annuum*), lilek brambor (*Solanum tuberosum*), mrkev obecná (*Daucus carota*) a další. Koncovým a z hospodářského pohledu významným hostitelem je réva vinná (*Vitis vinifera*) (např. Battle *et al.*, 2007; Fialová *et al.*, 2009).

3.5.4 Příznaky stolburové infekce

Příznaky vyskytující se v infikovaných rostlinách se liší druhem fytoplazmy a fází infekce. Ve většině případů mají fytoplazmy na rostliny škodlivý účinek, ale existují i případy tolerantních druhů rostlin, kde se příznaky neprojeví vůbec nebo jen v malé míře (Lee *et al.*, 2000).

Mezi typické příznaky stolburu patří malformace a vysychání květů, zakrnělý růst, žloutenka, svinutka či změna zbarvení listů. Příznaky se mohou lišit v závislosti na hostitelské rostlině, kultivaru, a klimatických podmínkách, jako jsou vlhkost, teplota a další (Riedle-Bauer *et al.*, 2006; Fialová *et al.*, 2009).

Na vinicích způsobuje fytoplazma stolburu závažnou chorobu tzv. Bois Noir (BN). Patří mezi nejčastější a nejzávažnější nemoci vinné révy v Evropě. Mezi nejčastější příznaky (obr. č. 1) této žloutenky patří: svinutka, chloróza listových žilek, nekróza a červené zbarvení listů (u červených odrůd hroznů), nedokonalá lignifikace stonku (Battle *et al.*, 2000; Avramov *et al.*, 2008; Berger *et al.*, 2009, Starý *et al.*, 2013). Na vinicích způsobuje znehodnocení plodů, čímž dochází ke snížení jejich kvality a k ekonomickým ztrátám (Battle *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2009). Příznaky této choroby jsou lehce zaměnitelné se žloutenkou révy vinné, chorobou Flavescence dorée, vyvolané nepříbuznou fytoplazmou ze skupiny 16Sr-V.



Obr. č. 1: Příznaky stolbuové infekce u révy vinné

3.5.5 Vektoři fytoplazmy stolburu

Přenos fytoplazmové infekce je uskutečňován prostřednictvím hmyzích vektorů různých druhů. Důležitou, ve studiu vztahu vektor-fytoplasma-rostlina, je tzv. doba latence, kdy není hmyz schopen přenášet fytoplasma na zdravé rostliny. Toto období může trvat různě dlouho, od několika hodin po několik týdnů (Bertaccini, 2007).

Za nejdůležitějšího vektora fytoplazmy stolburu je považován *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865). Vyskytuje se především na evropském kontinentu, ale byl také nalezen v některých regionech Asie. Nejsevernější výskyt byl hlášen z Polska a Německa. Tento vektor je polyfágní, ale přednostně saje na rostlinách z čeledi *Solanaceae* (Valenta, 1953; Sforza *et al.*, 1998).

Ve střední a jižní Evropě byla potvrzena přítomnost i jiných vektorů, jako jsou *Macrosteles laevis* (Ribaut, 1927), *Aphrodes bicinctus* (Schrank, 1776), *Pentastiridius beieri* (Wagner, 1970) (Gatineau *et al.*, 2001), *Anaceratagallia ribauti* (Ossiannilsson, 1938) (Riedle-Bauer *et al.*, 2008), *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum, 1868) (Battle *et al.*, 2007; Riedle-Bauer *et al.*, 2008).

U řady hmyzích zástupců byla potvrzena přítomnost fytoplazmy stolburu, ale přenos s jejich pomocí nebyl potvrzen, mohlo by se jednat o tzv. potenciální vektory. Patří mezi ně například: *Emelyanoviana mollicula* (Boheman, 1845), *Eupteryx atropunctata* (Goeze, 1778), *Dryodurgades reticulatus* (Herrich-Schäffer, 1834), *Anoplotettix fuscovenosus* (Ferrari, 1882), *Macrosteles sardus* (Ribaut, 1948),

Mocuellus collinus (Boheman, 1850), *Reptalus panzeri* (Löw, 1883) (Riedle-Bauer *et al.*, 2006).

Nicméně fytoplasma stolburu byla detekována i u dalších hmyzích zástupců ze skupin ploštic (*Heteroptera*) a mer (*Psylloidea*) jako jsou: *Trioza urticae* (Linneaus, 1758), *Adelphocoris lineolatus* (Goeze, 1778), *Lygus rugulipennis* (Poppius, 1911) (Korbášová, 2012).

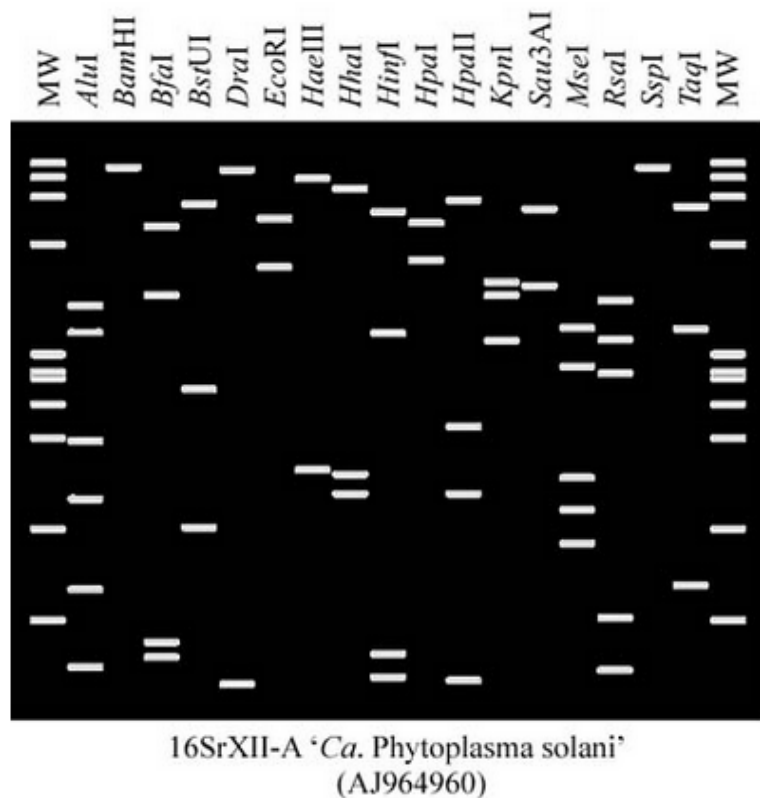
3.6 Genetická variabilita stolburu

Pro studium variability se nejčastěji používá ribozomální, konzervativní gen 16S rRNA (Schneider *et al.*, 1997; Seemüller *et al.*, 1998 Langer *et Maixner*, 2004) a dále neribozomální geny, např. *Tuf*, *Sec-Y*, *vmp1*, které vykazují větší variabilitu (Seemüller *et al.*, 1998; Cimerman *et al.*, 2009; Fialová *et al.*, 2009).

3.6.1 Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA se vyskytuje u všech prokaryot. Jeho variabilní a konzervativní oblasti jsou důležité pro klasifikaci a detekci fytoplazem (Schneider *et al.*, 1997; Seemüller *et al.*, 1998; Langer *et Maixner*, 2004). Na obrázku č. 2 je znázorněn virtuální RFLP profil fytoplazmy stolburu (*'Candidatus phytoplasma solani'*) odpovídající produktům R16F2/R2 naštípanými různými restrikčními enzymy.

Protože je však sekvence tohoto genu u izolátů pocházející z různých geografických oblastí a různých rostlinných a hmyzích hostitelů obecně málo variabilní, používají se při studiu diverzity a fylogenetických vztahů u fytoplazmy stolburu úseky neribozomálních genů (*Tuf*, *vmp1*, *Sec-Y*) (Seemüller *et al.*, 1998; Cimerman *et al.*, 2009; Fialová *et al.*, 2009).



Obr. č. 2: Virtuální RFLP profily u R16F2/R2 sekvence 16S rDNA u '*Candidatus phytoplasma solani*'

3.6.2 Gen *Tuf*

Elongační faktor Tu je kódován *Tuf* genem a podílí se při transkripci fytoplazem. Studia zabývající se tímto genem naznačují vyšší variabilitu, než jaká je u genu 16S rRNA. Toho se využívá při diferenciaci a především klasifikaci fytoplazem (Schneider *et al.*, 1997).

Variabilitou *Tuf* genu se jako první zabývali Langer *et Maixner* (2004). Amplifikací tohoto genu s primerovými páry fTufAy/rTufAy a následnou RFLP analýzou získali 3 charakteristické profily, vyskytující se v německých izolátech révy vinné, rezervoárových rostlinách (*Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*) a hmyzím vektoru *Hyalesthes obsoletus*.

U izolátů z vinné révy a z *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) byly získány 3 profily (VK-I, II a III). Přičemž genotyp VK-III je dosud vzácný a byl detekován pouze v Německu. Nejtypičtějším profilem vinné révy je VK-I, vyskytující se ve většině

vinařských oblastí na tomto území. Rostlinný hostitel opletník plotní (*Calystegia sepium*) byl spojen s profilem VK-II a III. Restrikční profil VK-II byl také detekován u svlačce rolního (*Convolvulus arvensis*) a profil VK-I u kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*). Nejčastějším a zároveň nejrozšířenějším profilem v Německu je VK typ II.

V jiných evropských zemích např. v Chorvatsku a Itálii byly objeveny profily Tuf-a (Tuf-I) a Tuf-b (Tuf-II) odpovídající výše zmíněným profilům. Nejfrekventovanějším byl v těchto zemích genotyp Tuf-b (Pacífico *et al.*, 2009; Murolo *et al.*, 2010; Music *et al.*, 2011).

3.6.3 Gen *vmp1*

Stol-1H10 neboli gen pro variabilní membránový protein (*vmp1*) vykazuje vysoký polymorfismus, proto je často používán pro studium diverzity u fytoplazem stolburu (Pacífico *et al.*, 2009). Gen kóduje VMP1 protein, skládající se z 557 aminokyselin. Tento protein je zapojen v interakci mezi fytoplazmou a hostitelem (Cimerman *et al.*, 2009).

Větší variabilitu než u předchozího genu *Tuf* potvrdili ve svých studiích například Cimerman *et al.* (2009), Pacífico *et al.* (2009), Murolo *et al.* (2010), Music *et al.* (2011) a další.

Murolo *et al.* (2010) získali pomocí nested PCR dva fragmenty o velikostech 1700 bp a 1450 bp. RFLP analýzou s užitím *RsaI* enzymu detekovali u vzorků z révy celkem 9 profilů (V2, V3, V4, V5, V12, V14, V15, V16). Genotypy V3 a V5 měly vysokou korelaci s izoláty vykazující Tuf-a genotyp, nalezených v oblastech Abruzzi, Marche a Campania. Ostatní profily byly spojovány s Tuf-b typem, přičemž nejčastějším byl profil V14 (u 34 vzorků). Největší rozsah zjištěných profilů byl hlášen z Marche. Na tomto místě a v Abruzzii byly 2 vzorky fytoplazmy stolburu ukazující na směsnou infekci (profil V4 a V12). U bylinných a plevelných vzorků bylo identifikováno pouze 6 profilů (V2, V12, V14, V15 a V17). Nejčastějším profilem byl na rozdíl od vinné révy profil V12 nacházející se u všech analyzovaných rostlinných druhů kromě papriky. U rajčete se vyskytovalo nejvíce profilů (V2, V12, V14, V15 a V17). Stejně jako u vzorků z vinné révy byla i zde přítomna směsná infekce u tabáku v Campanii (V12 a V16 a) a u svlačce v Abruzzii (V12 a V15).

V práci Pacífico *et al.* (2009) byla sledovaná variabilita vyšší. Gen *vmp1* poskytl 3 různé produkty, jež byly podrobeny RFLP analýze (*RsaI*). Výsledkem bylo 11

odlišných V profilů, přičemž V5 – V8 byly získány z fragmentu dlouhého 1570 bp. Profily V1 - V4 a V9 - V11 vznikly z amplikonu 1820 bp. Největší amplikon (2070 bp) poskytl profil podobný profilu V11, použitím jiného restrikčního enzymu (*AluI*) byl získán nový profil V12. V Chorvatsku bylo RFLP analýzou s restrikčním enzymem *HpaI* odlišeno pouze 5 profilů (V3, V4, V5, V14 a směs V2 a V18).

3.6.4 *Sec-Y* gen

SecY gen kóduje podjednotku translokázového proteinu ('translocase subunit'). Studium sekvenční variability tohoto genu bylo úspěšně použito k rozlišení izolátů různých skupin fytoplazem, jako např. ze skupiny 16SrV - Flavescence dorée (Kuzmanovic *et al.*, 2008), 16SrI - fytoplazma žloutenky aster (Lee *et al.*, 2006) nebo 16SrX - skupiny fytoplazmy proliferace jabloně (Danet *et al.*, 2007).

Podobné výsledky byly získány i v případě tří existujících studií variability *SecY* genu u izolátů fytoplazmy stolburu. Analýzou *SecY* sekvencí byla zjištěna variabilita, je ale výrazně nižší než v případě *vmpI* genu. V souboru izolátů udržovaných na *Catharanthus roseus* původem z různých hostitelů, réva vinná, rajče, paprika a vektorů, *H. obsoletus* z různých zemí, Francie, Itálie, Německo, Libanon a Srbsko, bylo identifikováno 8 jednonukleotidových záměn (SNPs) (Cimerman *et al.*, 2008, 2009; Fialová *et al.*, 2009;).

3.7 Fytoplazma stolburu v České republice

V první polovině 20. století, v bývalém Československu, způsobily epidemie stolburu značné ztráty ve výnosu zemědělských plodin jako jsou brambory, rajčata, paprika. Na začátku šedesátých let však došlo k výraznému snížení až vymizení choroby pravděpodobně vlivem používání herbicidů a insekticidů v intenzivním zemědělství, které pravděpodobně vedlo k vyhubení hmyzích vektorů (Navrátil *et al.*, 2009).

Na jižní Moravě došlo, po roce 2000, ke znovuobjevení a opětovnému nárůstu výskytu této fytoplazmy (Březíková *et al.*, 2007; Navrátil *et al.*, 2009). Faktorem, který pravděpodobně způsobil tento vzrůst, byl pokles používání pesticidů na tomto území, čímž došlo ke zmnožení rezervoárových rostlin, které jsou známými hostiteli fytoplazmy stolburu a také šíření vektora, *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (Šafářová *et al.*, 2011). Výskyt stolburu a patogena fytoplazmy stolburu, který tuto chorobu způsobuje, byl intenzivně studován na jižní Moravě, v Lednické oblasti.

Tato lokalita je významnou zemědělskou oblastí, s intenzivními plochami rajčat, paprik a celeru, ale také významnou vinařskou oblastí (Navrátil *et al.*, 2009). Na zkoumaných polích byla potvrzena přítomnost stolburu, plodiny vykazovaly typické příznaky infekce. Intenzita příznaků vedla i k významným ekonomickým ztrátám jak u paprik (až 14 %) tak u rajčat (až 9 %), kde byl zároveň zaznamenán největší výskyt fytoplazmy stolburu (15 %) (Navrátil *et al.*, 2009). Navíc byl v této oblasti potvrzen i výskyt infikovaných rezervoárových rostlin, svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*) a kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), které poskytovaly vhodné podmínky pro šíření stolburu (Fialová *et al.*, 2009).

Výskyt fytoplazmy stolburu byl sledován ve vinařské oblasti na Moravě a v Čechách (Starý *et al.*, 2013). Na Moravě byl zaznamenán výskyt fytoplazmy stolburu na révě vinné s různou intenzitou, nejextrémnější výskyt (65 %) byl zjištěn v r. 2005 v lokalitě Božice, naopak v lokalitě Perná se incidence pohybovala okolo 5%. V Čechách byl výskyt fytoplazmy stolburu v období 2005 - 2011 na vinicích zjištěn jen sporadicky, což je spojována s tím, že vinice v Čechách byly vysazeny později a že se zde nevyskytuje vektor stolburu *Hyaletthes obsoletus* (Starý *et al.*, 2013). Za vektora fytoplazmy stolburu je v České republice považován *Hyaletthes obsoletus*, jehož výskyt byl potvrzen na jižní Moravě. Na lokalitách Perná, Lednice, Březí a Podivín byla pomocí nested PCR /RFLP analýzy potvrzena přítomnost fytoplazmy stolburu v jeho samcích, samicích i larvách. Přítomnost fytoplazmy stolburu byla zjištěna i u zástupců r. *Empoasca* a *Lygus* (Březíková *et al.*, 2007; Šafářová *et al.*, 2011)

V české republice byl prováděn i výzkum genetické variability u fytoplazmy stolburu, a to na jižní Moravě v oblasti jejího výskytu, na lokalitách Březí, Lednice a Perná. Důležité informace o variabilitě poskytly RFLP a sekvenční analýzy neribozomálních genů *Tuf*, *vmp1*, *Sec-Y*. *HpaII*/RFLP analýzou 940 bp dlouhého produktu *Tuf* genu byly sledované izoláty přiřazeny ke genotypu Tuf-b. Jedná se o nejčastěji zjišťovaný genotyp, který je spojován s rezervoárovou rostlinou svlačcem. Zajímavostí je, že v Březí byl tento profil přítomen u kopřivy, u které se očekává výskyt genotypu Tuf-a (Fialová *et al.*, 2009).

S ohledem na variabilitu *vmp1* genu bylo pomocí restriční endonukleázy *RsaI* získáno 5 *vmp1* profilů (I-V). Nejčastěji detekovaný byl profil I. Profily II, III a V byly nalezeny pouze v Lednici a profil IV pouze v Březí u vinné révy a kopřivy (Fialová *et al.*, 2009).

Nižší variabilita byla zjištěna v případě analýzy *SecY* genu. České stolburové izoláty se rozdělily do dvou skupin. Většina českých izolátů byla identická s referenčním izolátem původem z Francie, část byla identická s izolátem původem z Německa (Fialová *et al.*, 2009).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

V experimentální části byl použit materiál z hmyzích vektorů fytoplazmy stolburu ostruhovník škvorový, *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) (potenciální vektor) a žilnatka vironosná, *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (obr. č. 2). Celkem bylo analyzováno 43 jedinců *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) a 28 jedinců *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) různého pohlaví (samci, samice, larvy 5. instaru). Hmyzí vektoři byli odchyceni na rezervoárových rostlinách, na svlačci (*Convolvus*) a kopřivě (*Urtica*). Vzorky pocházely z lokality Perná na jižní Moravě (Česká republika). Sběr byl proveden 29.6.2011. Hmyzí vzorky byly po odchytu uchovávány v 96% etanolu při teplotě -80 °C. Odchyt jedinců byl proveden pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů (Mgr. Martin Starý), vlastní determinaci provedl dr. Pavel Lauterer (Moravské muzeum, Brno).



Obr. č. 2: *Dicranotropis hamata* (vlevo) a *Hyalesthes obsoletus* (vpravo)

4.2 Metody

4.2.1 Izolace celkové DNA

Extrakt celkové DNA z jednotlivých jedinců hmyzu byl získán prostřednictvím komerčního kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Izolace byla

prováděna v 1,5 ml mikrozkušavkách, do kterých bylo přidáno 200 µl Nucleis lysis solution do něj byl přidán jeden jedinec a pomocí UH mikrohomogenizátoru byl rozetřen. Vzniklá směs byla inkubována v termobloku při teplotě 65 °C po dobu 15 min. Po prvních 7 min byla směs promíchána. Následně byly vzorky ponechány 5 min při pokojové teplotě. V dalším kroku byly k lyzátu přidány 3 µl RNase solution a ependorfky byly promíchány obrácením (25x) a poté centrifugovány krátkým pulsem – 5 000 rpm po dobu 10 s. Směs byla inkubována 15 min při teplotě 37 °C a poté 5 min při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 67 µl roztoku Protein Precipitation solution. Vzorky byly vortexovány 20 s při 1 600 rpm a poté 5 min chlazeny na ledu a opětovně centrifugovány 4 min při 13 000 g. Supernatant obsahující DNA byl přepipetován do nových 1,5 ml mikrozkušavek, k němu bylo přidáno 200 µl isopropanolu. Proteinový pelet byl odstraněn. Vzorky byly promíchány převrácením zkumavky (5x) a inkubovány při teplotě -20 °C.

Následující den byly vzorky centrifugovány 1 min při 13 000 g. Z mikrozkušavky byl opatrně odstraněn supernatant a k bílému peletu obsahujícímu DNA bylo přidáno 200 µl 70% etanolu. Mikrozkušavky byly po převrácení centrifugovány 1 min při 13 000 g, poté byla otevřená zkumavka ponechána na filtračním papíře, aby se odstranil zbytkový etanol. V dalším kroku byly vzorky vysušeny ve vakuové odparce po dobu 30 min při teplotě 45 °C. Následujících 10 min byly vzorky ponechány na třepačce při 65 °C. DNA byla rozpuštěna v 50 µl Rehydration Solution a inkubována při 4 °C přes noc.

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky, pomocí spektrofotometru NanoDrop1000. Izolovaná DNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě -20°C.

4.2.2 PCR amplifikace

Přítomnost fytoplazmy v jednotlivých vzorcích byla detekována pomocí nested PCR amplifikací 16S rRNA genu. Tato metoda využívá dvou polymerázových reakcí, kdy produkt první PCR je použit jako templát v druhé reakci. Výhodou tohoto postupu je možnost detekovat DNA o velmi nízké koncentraci, nevýhodou je vysoké riziko kontaminací.

U vzorků pozitivních na fytoplazmy stolburu byly pomocí nested PCR, se specifickými primery a za různých předem definovaných podmínek amplifikovány i další neribozomální geny (*Tuf*, *Sec-Y* a *vmp1*).

4.2.2.1 Nested PCR

Nejdříve byla připravena reakční směs (premix). Reakční směs pro nested PCR byla připravována za sterilních podmínek v laminárním boxu. Celý postup byl prováděn na ledu, aby nedocházelo k nespecifickým reakcím.

Do 1,5 ml zkumavek byly rozpipetovány jednotlivé složky reakční směsi podle zadaných objemů (tabulka č. 1). Mikrozkušavky s reakční směsí byly krátce stočeny na minicentrifuze, zvortexovány a znovu stočeny. Posléze byly přidány 2 μ l DNA vzorku a celková směs byla opět stočena. V druhém amplifikačním kroku byl nejdříve produkt předchozí reakce naředěn 40x (2 μ l amplikonu první reakce a 78 μ l sterilní vody). Po skončení přípravy byly zkumavky vloženy do termocykléru. Amplifikace byla spuštěna dle PCR podmínek definovaných v tabulkách č. 2 - 4.

V PCR reakcích byly použity ribozomální primery, jejichž sekvence a velikost PCR produktů je uvedena v tabulce č. 5.

Tab. č. 1: Složky reakční směsi pro PCR

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Na 1 test [μ l]
MyTaq reakční pufr	5 x	1 x	4
MgCl ₂	25 mM	0 mM	0
Voda			13,4
dNTP	2 mM	0 mM	0
f primer *	20 pmol/ μ l	0,2 mM	0,2
r primer **	20 pmol/ μ l	0,2 mM	0,2
MyTaq DNA polymeráza	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,2
Objem reakční směsi			18 μ l
Objem vzorku			2 μ l
Objem reakce			20 μ l

*forward primer (P1, F2, fTuf1, fTufAy, PosecF1, PosecN2, StoIH10F1, TYPH10F)

** reverse primer (P7, R2, rTuf1, rTufAy, PosecF2, PosecR3, StoIH10R1, TYPH10R)

Tab. č. 2: Podmínky PCR pro 16S rRNA gen

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
P1/P7			
Pre-denaturace	95	2	1
Denaturace	95	1	35
Annealing (navázání primerů)	55	2	
Syntéza cílového úseku	72	3	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1
R16F2/R16R2			
Pre-denaturace	95	2	1
Denaturace	95	1	35
Annealing (navázání primerů)	55	2	
Syntéza cílového úseku	72	3	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1

Tab. č. 3: Podmínky PCR pro *Tuf* gen

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
fTuf1/ rTuf1			
Pre-denaturace	95	1,5	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	45	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	1	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1
fTufAy/ rTufAy			
Pre-denaturace	95	0,5	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	55	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	1	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1

Tab. č. 4: Podmínky PCR pro *Sec-Y* gen

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
PosecF1/PosecF2			
Pre-denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	54	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	1	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1
PosecN2/PosecR3			
Pre-denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	52	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	1	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1

Tab. č. 5: Podmínky PCR pro *vmp1* gen

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
StolH10F1/ StolH10R1			
Pre-denaturace	94	4	1
Denaturace	94	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	52	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	2	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1
TYPH10F/TYPH10R			
Pre-denaturace	94	4	1
Denaturace	94	0,5	35
Annealing (navázání primerů)	52	0,5	
Syntéza cílového úseku	72	1,5	
Elongace (dosyntetizování)	72	10	1

Tab. č. 6: Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
16S rRNA			
P1 P7	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	cca 1800	Deng a Hiruki, 1991; Schneider <i>et al.</i> , 1995
R16F2 R16R2	ACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	cca 1200	Lee <i>et al.</i> , 1993
Tuf			
fTuf1 rTuf1	CACATTGACCACGGTAAAC CCACCTTCACGAATAGAGAAC	cca 1080	Schneider <i>et al.</i> , 1997
fTufAy rTufAy	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA CGTTGTACCTGGCATTACC	cca 950	
Sec-Y			
PosecF1 PosecF2	TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT ATTAGTAAACTAGTTCCTCC	cca 1052	Fialová <i>et al.</i> , 2009
PosecN2 PosecR3	CCATCAAAACTTTTTGGTTTAGGC GCCCTATAACGGTGATTTTGA	cca 998	
vmp1			
StolH10F1 StolH10R1	AGGTTGTAATAATCTTTTATGT GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC	cca 1850	Pacifico <i>et al.</i> , 2009; Fialová <i>et al.</i> , 2009
TYPH10F TYPH10R	AACGTTTCATCAACAATCAGTC CACTTCTTTCAGGCAACTTC	cca 1450	

4.2.3 Gelová elektroforéza

Výsledné amplikony nested PCR byly podrobeny elektroforetické separaci v 1% agarózovém gelu.

Na přípravu zásobního roztoku byly použity 3 g agarózy a 300 ml TAE pufru (1x). Z tohoto zásobního roztoku bylo 50 ml rozvařeno v mikrovlnné troubě a posléze nalito do kádinky. Při ochlazení gelu přibližně na teplotu 65 °C byly přidány 3 µl fluorescenčního barviva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, SBS Genetech) pro pozdější vizualizaci DNA. Po promíchání byl gel nalit do předem připravené vaničky s hřebínky a při pokojové teplotě byl ponechán ztuhnout. Po 30 min byla vanička s gelem vložena do elektroforetické komory. Gel byl přelit TAE pufrům (1x) po odpovídající rysku, s hladinou přibližně 0,5 cm nad gelem, a z gelu byly vytaženy hřebínky.

Do první jamky byly naneseny 2 µl markeru molekulové hmotnosti (Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas). Do ostatních jamek bylo naneseno 5 µl

vzorku, které byly na parafilmu promíchány s 2 µl 0,1% bromfenolové modři rozpuštěné v 30% glycerínu, kvůli sedimentaci vzorku na dno jamky. Produkty byly separovány pomocí stejnosměrného proudu o napětí 80 V po dobu přibližně 45 min. Poté byly PCR produkty vizualizovány pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentovány programem GeneSnap (Syngene).

4.2.4 RFLP analýza

Produkty pozitivní na přítomnost fytoplazmy pocházející z vektora *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) byly podrobeny RFLP analýze. Cílem bylo identifikovat detekovanou fytoplazmu. U *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) tato analýza provedena nebyla, protože pro analýzu byly vybrány vzorky, u nichž byla přítomnost fytoplazmy stolburu prokázána již dříve.

RFLP analýza byla provedena pomocí restrikčních endonukleáz *RsaI* a *MseI* podle pokynů výrobce (Fermentas). Byla připravena reakční směs pro počet analyzovaných vzorků, složení je uvedeno v tabulce č. 7, ta byla rozpipetována do jednotlivých 0,5 ml zkumavek a k reakční směsi bylo přidáno 7 µl produktu nested PCR. Celková směs byla zakápnuta kapkou parafínového oleje a následně byla krátce stočena, promíchána vortexováním a opět stočena. Zkumavky byly inkubovány v termobloku při 37 °C přes noc.

Tab. č. 7: Složení reakční směsi pro RFLP analýzu

Položka	Množství na 1 test [µl]
Pufr 10x	1,25
BSA 10x	1,3
Voda	1
Restrikční enzym [10 U/µl]	0,2
Produkt nested PCR	7
Celkový objem reakce	12,55

Byl připraven 2,5% agarózový TBE gel (MetaPhor® Agarose, Lonza), k 50 ml agarózy byly přidány 3 µl barviva GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) pro vizualizaci produktů štípání.

Do jamek byly nanášeny 3 µl vzorku, které byly předem smíchány se 2 µl bromfenolové modři (0,1% v 30% glycerínu). Do první a poslední jamky byly nanášeny 2 µl markeru molekulové hmotnosti (Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder,

Fermentas). Produkty byly separovány pomocí stejnosměrného proudu o napětí 50 V, po dobu přibližně 2 h. Poté byly PCR produkty vizualizovány pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentovány programem GeneSnap (Syngene).

4.2.5 Sekvencování

Pro studium variability byly zvoleny geny 16S rRNA, *Sec-Y* a *vmp1*.

4.2.5.1 Izolace PCR produktu z gelu

PCR produkty byly izolovány pomocí komerčního kitu (QIAquick Gel Extraction KIT, Qiagen, podle QIAquick Spin Handbook 07/2002).

PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu s přidavkem 4 μ l ethidium bromidu (10 mg/ml) v prostředí TAE pufru, za standardních podmínek (80V/45 min).

Do první jamky byly nanášeny 2 μ l markeru molekulové hmotnosti (Gene RulerTM 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas). Veškerý PCR produkt byl smíchán se 3 μ l bromfenolové modři (0,1% v 30% glycerínu) a napipetován do dvou jamek gelu. Po elektroforetické separaci byl gel umístěn na UV transluminátor určený pro vyřezávání z gelu. Za procházejícího UV světla byl pomocí sterilního skalpelu vyříznut produkt reakce, který byl vložen do předem zvážených mikrozkušavek firmy Eppendorf. Na každý vzorek byl použit vždy nový skalpel.

Zkušavka byla opětovně zvážena a z rozdílu hmotností byla zjištěna hmotnost vyříznutého gelu. Poté byl přidán QG pufr v trojnásobném množství než byla hmotnost gelu. Posléze byl gel s QG pufrem inkubován maximálně 10 min při 50 °C nebo dokud se gel nerozpustil. Směs byla promíchána přibližně po 2 - 3 min. Ke směsi byl přidán 1 objem isopropanolu (při navážce gelu 100 mg bylo přidáno 100 μ l). Směs byla promíchána a maximálně 700 μ l směsi bylo nanášeno do předem připravené kolonky (fialová kolonka byla vložena do sběrné zkušavky). Byla provedena centrifugace při 13 000 rpm po dobu 1 min. Ze sběrné zkušavky bylo vylito, co protéklo. Pokud bylo směsi více, krok byl zopakován. Posléze bylo do kolonky přidáno 500 μ l QG pufru. Byla provedena centrifugace za stejných podmínek (13 000 rpm/1 min). Obsah sběrné zkušavky byl vylit a kolonka byla vrácena do sběrné zkušavky. Do kolonky bylo přidáno 750 μ l PE pufru, ta byla opětovně centrifugována (13 000 rpm/1 min). Po vylití obsahu jímací zkušavky, byla kolonka centrifugována naprázdno (13 000 rpm/1 min),

aby bylo dosaženo úplného vysušení. Poté byla kolonka umístěna do nové 1,5 ml zkumavky. Na kolonku bylo nanášeno 50 μ l destilované vody a byla provedena poslední centrifugace (13 000 rpm/1 min). Vyizolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

4.2.5.2 Fluorimetrické stanovení koncentrace

Koncentrace izolované DNA byla stanovena flurometricky pomocí fluorometru DyNA Quant 200 (Hofer).

4.2.5.3 Sekvenační značení

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems). Pro každý vzorek byla připravena reakční směs o celkovém objemu 10 μ l, její složení je uvedeno v tabulce č. 8.

Typy primerů a koncentrace DNA použité pro sekvenační značení se lišily v závislosti na velikosti DNA fragmentu (tabulka č. 9), jednotlivé fragmenty byly sekvenovány oboustranně, v případě dlouhých fragmentů byly použity i další, vnitřní primery (tabulka č. 10).

Sekvenační značení bylo provedeno podle pokynů výrobce, podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tabulce č. 11. Samotná sekvenační analýza byla realizována genetickým analyzátozem ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB AV ČR, Olomouc.

Tab. č. 8: Složení reakční směsi pro sekvenační značení

Položka	Množství na 1 test [μ l]
Pufir 10x	1
BigDye	1
Primer (1,6 pmol/ μ l)	2
templátová DNA	6
Celkový objem reakce	10

Tab. č. 9: Množství DNA pro jednotlivé geny

Sekvenační primer	Množství templátové DNA [ng]
16S rRNA	
R16F2 R16R2 fU5 rU3	40
Sec-Y	
PosecN2 PosecR3	35
vmp1	
TYPH10R TYPH10F 1H10R4	50

Tab. č. 10: Sekvence použitých vnitřních primerů

Primer	Sekvence 5' 3'	Reference
16S rRNA		
fU5 rU3	CGGCAATGGAGGAAACT TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Lorenz <i>et al.</i> , 1995
vmp1		
1H10R4	AACTGCAGCTTGAGTTCTTGC	Cimerman <i>et al.</i> , 2009

Tab. č. 11: Podmínky PCR pro sekvenační značení

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	96	1 min	1
Denaturace	96	10 s	35
Annealing (navázání primerů)	50	5 s	
Syntéza cílového úseku	60	4 min	
Elongace (dosyntetizování)	10	10 min	1

4.2.5.4 Analýza sekvencí

Za pomoci programu Seqman (DNASTAR, Lasergene) byly obousměrné sekvence analyzovaných DNA fragmentů složeny do konečné sekvence (‘contig’). Jejich identita byla zjištěna porovnáním se známými sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu Blast (BLAST, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

Získané sekvence byly seřazeny pomocí algoritmu Clustal v programu Alignment Explorer (Mega 5.1.), krátké sekvence byly z další analýzy vyřazeny. Získaná sekvenční matice byla použita pro analýzu genetické variability, fylogenetické vztahy byly následně hodnoceny pomocí neighbor-joining analýzy programu Mega 5.1, bootstrap opakování 500x. Získaný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí TreeExplorer (Mega 5.1) (Tamura *et al.*, 2011).

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

4.3 Přístrojové vybavení, použité roztoky a chemikálie

Přístrojové vybavení, použité chemikálie a roztoky, které byly používány v experimentální části bakalářské práce, jsou uvedeny v abecedním seznamu v následujících kapitolách.

4.3.1 Přístrojové vybavení

1. Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
2. Elektroforéza, zdroj stejnosměrného proudu Power Pack P 25 (Biometra)
3. Fluorimetr DyNA Quant 200 (Hoefer)
4. Laminární box PV-100 (Telstar)
5. Mikrovlnná trouba
6. Minicentrifuga E-Centrifuge (Wealtec)
7. Minicentrifuga Spectrafuge™ 24D Digital Microcentrifuge (Labnet)
8. Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
9. Teplotní lázeň mixing block MB 102 (Bioem)
10. Termoblok Dri-block® DB-20 (Techne)
11. Termocyklér T-Personal (Biometra)
12. Thermo Savant DNA SpeedVac® SPD111V (Thermo Scientific)
13. UV transluminátor G: Box, dokumentační systém Syngene (Herolab)
14. UV transluminátor UVT – 14L (Herolab)
15. Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.
16. Vortex MS1 Minishaker IKA (Profilab)

4.3.2 Použité chemikálie a roztoky

1. 0,1% bromfenolová modř v 30% glycerínu (Promega)
2. 70% etanol
3. 96% etanol
4. Agarose for DNA electrophoresis (Serva)
5. Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems)
6. Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
7. Gene Ruler™ 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)
8. GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS Genetech)

9. Isopropanol
10. Methaphor® Agarose (Lonza)
11. MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline)
12. QIAquick Gel Extraction KIT (Qiagen)
13. sterilní voda
14. TAE pufr 1x – pracovní roztok: 40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA
15. TAE pufr 50x - zásobní roztok: 242 g Tris base, 57,1 ml ledová kyselina octová, 37,2 g Na₂EDTA . 2H₂O (doplnit H₂O na 1000 ml a upravit pH na 8,5)
16. TBE pufr 10x - zásobní roztok: 108 g Tris base, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5M EDTA (doplnit H₂O na 1000 ml a upravit pH na 8)
17. TBE pufr 1x - pracovní roztok: 89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA
18. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

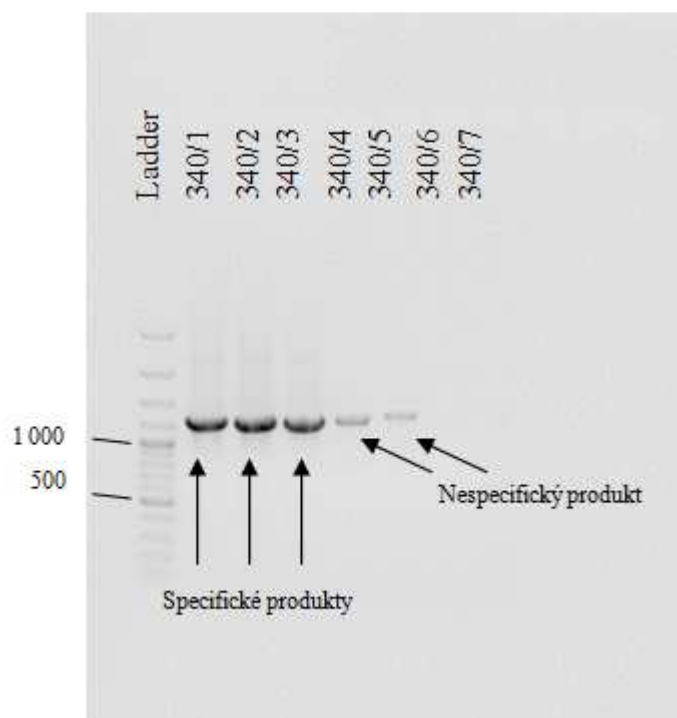
5. VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bylo detekovat fytoplazmy v potenciálním hmyzím vektoru *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847), odchycených na lokalitě Perná dne 29.6.2011. Celkem bylo analyzováno 41 jedinců, ze kterých byla úspěšně izolována celková DNA (tabulka č. 12).

Tab. č. 12: Koncentrace a čistota izolované DNA

Číslo vzorku	Koncentrace [ng/μl]	A _{260/280}
340/1	232,30	1,92
340/2	294,70	1,84
340/3	50,90	2,18
340/4	39,80	2,33
340/5	577,10	1,68
340/6	1301,10	1,76
340/7	141,60	1,90
341/1	62,20	2,01
341/2	63,90	1,91
341/3	56,90	1,92
341/4	38,20	1,89
341/5	29,90	2,06
341/6	84,20	1,82
342/1	50,30	2,00
342/2	75,50	1,95
342/3	36,10	2,04
342/4	77,40	1,78
342/5	16,80	2,18
342/6	30,80	2,03
346/1	390,30	1,65
346/2	642,00	1,68
346/3	135,20	1,81
346/4	296,70	1,76
346/5	2042,90	1,61
346/6	133,70	1,76
347/1	24,90	1,97
347/2	77,30	1,81
347/3	141,00	1,81
347/4	305,20	1,83
347/5	79,70	1,87
347/6	59,40	1,93
348/1	99,10	1,75
348/2	74,70	1,88
348/3	26,00	1,83
348/4	88,40	1,80
348/5	87,10	1,79
348/6	65,80	1,67
348/7	58,10	1,80
348/8	178,20	1,70
348/10	558,80	1,66
348/12	107,40	1,67

Nested PCR produkty očekávané velikosti (1 200 bp pro primerový pár R16F2/R2) byly získány u 9 vzorků ze 41 analyzovaných (obr. č. 2). A 9 vzorků vykazovalo fragmenty odlišných. U 7 analyzovaných samic byla fytoplazma detekována u 3 z nich, tj. v 17,1 % případů. Z 18 testovaných samců byly 4 na fytoplazmu pozitivní, což odpovídalo 43,9 %. V případě larev 5. instaru, byly z 16 analyzovaných pouze 2 larvy infikovány fytoplazmou. Procento infekčnosti dosahovalo 39,0 % (tabulka č. 13).



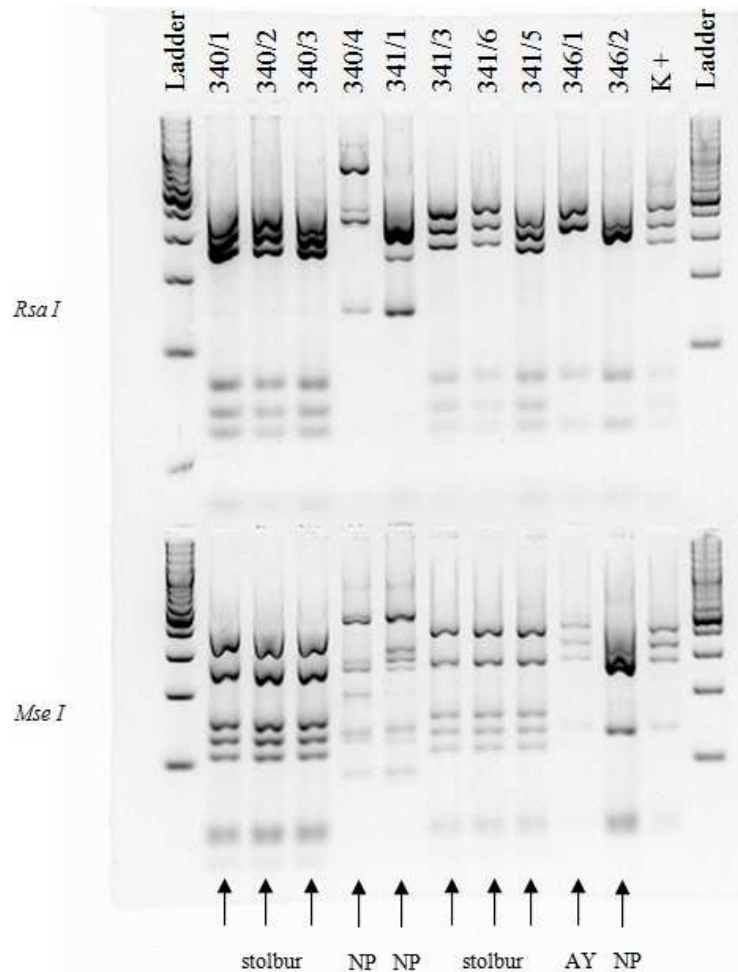
Ladder-Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas
340/1-7- vzorky DNA *D. hamata*

Obr. č. 3: Detekce fytoplazmy stolburu v *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847)

Tab. č. 13: Výsledky detekce fytoplazmy u *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847)

	počet testovaných	počet infikovaných	procento infikovaných
Samice	7	3	17,1
Samci	18	4	43,9
Larvy	16	2	39,0
Celkem	41	9	22,0

Restrikční analýzou byla přítomnost fytoplazmy stolburu jednoznačně zjištěna v 6 případech, vzorek fytoplazmy žloutenky aster (340/1) vykazoval charakteristický restrikční profil (obr. č. 3). Nespecifita produktů u vzorků 340/4, 341/1 a 346/2 byla potvrzena také RFLP analýzou. S využitím *RsaI* a *MseI* jako restrikčních enzymů byly u těchto izolátů získány profily, které neodpovídají fytoplazmě stolburu.



Ladder-Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas

340/1-4; 341/1,3,5,6; 346/1,2- vzorky DNA *D. hamata*

NP nespecifický profil

AY fytoplazma žloutenky aster

K+ stolburová pozitivní kontrola

Obr. č. 4: RFLP profily izolátů fytoplazem infikujících *Dicranotropis hamata*

Pro molekulárně-genetickou charakterizaci izolátů fytoplazmy bylo vybráno 9 izolátů (3 samice, 4 samci a 2 larvy) získaných z *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847). Tento soubor byl doplněn o 10 vzorků izolátů stolburu, získaných z hmyzího vektora žilnatky vironosné (*Hyalesthes obsoletus*, Signoret, 1865) (6 samic a 4 samci), odchycených na stejné lokalitě, ve stejném termínu.

Nested PCR amplifikací *Sec-Y* genu (s primerovými páry PosecF1/R1 → PosecN2/N3) byl u 13 izolátů detekován produkt o velikosti 998 bp. Z těchto 13 vzorků byl očekávaný fragment získán u 4 izolátů *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) (1 samice a 3 samci) a 9 izolátů *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (5 samic a 4 samci).

Úspěšnou amplifikací genu *vmp1* (s primery StolH10F1/R1 → TYPH10F/R) byly u 11 vzorků získány fragmenty očekávaných velikostí (1450 bp), z nichž 2 pocházely z *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) (1 samice a 1 samec) a 9 z *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (5 samic a 4 samci).

U 8 izolátů byly, pomocí primerů *f/rTuf1* → *f/rTufAy*, amplifikovány fragmenty o specifické velikosti 950 bp. 2 pozitivní amplikony pocházely z izolátů *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) (1 samice a 1 larva) a zbylých 6 bylo potvrzeno u izolátů z hmyzího vektora *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (4 samice a 2 samci). *Tuf* gen byl dále testován na variabilitu pomocí RFLP. Touto analýzou byl potvrzen restriční profil *Tuf-b*.

Amplifikací neribozomálních genů byly specifické produkty pocházející z různých hmyzích zástupců, získány s odlišnou úspěšností. Amplifikace byla zdařilejší u izolátů z *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865). Fragmenty očekávaných velikostí byly detekovány téměř u všech izolátů, např. u *Sec-Y* a *vmp1* genu byl výsledek pozitivní v 9 z 10 vzorků. Na rozdíl od *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847), kde byly specifické produkty amplifikovány jen v omezené míře. Značný rozdíl byl pozorovatelný především u genů *vmp1* a *Tuf*, pozitivní byly pouze 2 vzorky z 8. To naznačuje na neznámou variabilitu izolátů stolburu spojenou s hmyzími zástupci, ve kterých by se fytoplazma mohla odlišovat.

Tab. č. 14: PCR amplifikace genů 16Sr RNA *Sec-Y*, *vmp1* a *Tuf*

Číslo izolátu	340/1	340/2	340/3	341/1	341/3	341/5	341/6	346/2	324/1	324/4	311/2	311/5	311/6	311/9	311/12	311/18	311/21	311/24
Pohlaví	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	L ₅	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂
Vektor	<i>Dicranotropis hamata</i>								<i>Hyalesthes obsoletus</i>									
16S rRNA																		
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>SecY</i> gen																		
PCR	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>vmp1</i> gen																		
PCR	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Tuf</i> gen																		
PCR	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-

♀ samice; ♂ samec; L₅ larva 5. instaru
 + pozitivní reakce; - negativní reakce

Sekvenováním námi vybraných specifických produktů genu 16Sr RNA byla ověřena identita fytoplazmy stolburu (*Candidatus Phytoplasma solani*) pomocí databáze GeneBank. Porovnáním sekvencí izolátů získaných z *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) a *Hyalesthes obsoletus* (příklady sekvencí viz obr. č. 4) byla zjištěna fylogenetická příbuznost a minimální variabilita. Všechny získané sekvence 16S rDNA se lišily pouze v pozici 837 A/G (izoláty *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) 340/1, 340/2, 340/3, 341/3, 341/5, 341/6, izoláty *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) 324/1, 324/4, 311/2, 311/5, 311/6, 311/9, 311/12, 311/18, 311/21, 311/24) a vykazovaly 99% identitu se sekvencemi různých izolátů fytoplazmy stolburu dostupnými v databázi GenBank, např. se španělským izolátem z révy vinné 2642BN (Ac. No. AJ964960.1), italským izolátem z révy vinné BN-Fc213 (Ac. No. EU836644.1), ruským izolátem Rus93 (Ac. No. GU004375.1) nebo italským izolátem PTV (Ac. No. GU004374.1).

V případě vzorku 346/1, byl potvrzen zjištěný RFLP profil, sekvence fytoplazmy (obr. č. 4) odpovídá fytoplazmě žloutenky aster ze skupiny 16SrI, podskupiny F. Sekvence vykazuje 99% identitu s izoláty žloutenky aster – izolátem CVB (Ac. No. AY265212) nebo izoláty z *Macadamia integrifolia* (Ac. No. KC513772) a Ac. No. DQ266089.

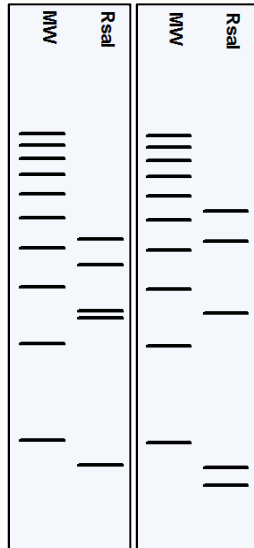
Variabilita izolátů fytoplazmy stolburu byla studována na základě dalších, neribozomálních genů *Sec-Y* a *vmp1*.

V případě genu *SecY*, byly získány sekvence čtrnácti izolátů. U všech, s výjimkou jednoho (obr. č. 5), byly získány identické sekvence, které vykazovaly 99% identitu se *SecY* geny izolátů fytoplazmy stolburu získanými např. z révy vinné v Chorvatsku (Ac. No. HQ413171.1), v Itálii (Ac. No. GU004355.1) nebo z kopřivy dvoudomé ze Slovinska (Ac. No. JQ977711.1) a z kozlíku lékařského ze Srbska (Ac. No. JX645765.1). Jediný odlišný izolát z *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865), 324/1, vykazoval 99% identitu např. s izolátem z barvínku ze Srbska (Ac. No. JX645766.1), Itálie (Ac. No. JQ797668.1) nebo Francie (Ac. No. FM163376.1).

Analýzou *vmpI* genu byla zjištěna obdobná variabilita jako v předchozích genech. Celkem bylo získáno 11 sekvencí, 9 z *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) a 2 z *Dicranotropis hamata* (Boheman, 1847) (obr. č. 6). Sekvence byly opět identické, a analýzou BLAST byla zjištěna jejich 98% shoda s italským izolátem Mag1 z révy vinné (Ac. No. HM008613.1), 97% identita s italským izolátem Mri10 z vinné révy (Ac. No. HM008615.1) a slovinským izolátem N3 z kopřivy dvoudomé (Ac. No. JQ977723.1), a 96% identitu se slovinským izolátem N13 z kopřivy dvoudomé (Ac. No. JQ977733.1). Výjimkou byl izolát 311/5 u něhož byla získána sekvence *vmpI* genu, která se od ostatních sekvencí lišila. Sekvence vykazovala 99% identitu s jugoslávským izolátem Red-Pepper z barvínku růžového (Ac. No. AM992103.1), 98% identitu s německým izolátem LA6 ze svačce rolního (Ac. No. JQ977735.1), 96% identitu s německým izolátem GGY z révy vinné (Ac. No. AM992102.1).

Fylogenetická analýza získaných izolátů a izolátů fytoplazmy stolburu dostupných v databázi GenBank pomocí neighbor-joining metody prokázala zjištěnou odlišnost. Analýzou jsme zjistili, že námi vybrané izoláty (311/2, 311/6, 311/9, 311/12, 311/18, 311/21, 311/24 a 340/3) tvoří samostatnou skupinu, která je nejvíc vzájemně příbuzná izolátu Mag1. Druhou skupinu tvořil izolát 311/5. Ten vykazoval největší příbuznost s izolátem Red-Pepper. Spolehlivost těchto skupin byla vysoká.

In silico *RsaI*/RFLP analýzou získaných *vmpI* sekvencí bylo zjištěno, že identické izoláty náleží k *vmpI* profilu I (V2), a odlišný izolát (311.5) náleží k profilu IV (V18) (obr. č. 5).



Obr. č. 5: *RsaI*/RFLP profily izolátů stolburu

(MW – marker molekulové hmotnosti, GeneRuler 100bp DNA ladder, Fermentas;

I – *vmp1* profil I, IV – *vmp1* profil IV)

311.5 TCTTTTTATT TTTAAAAGAC CTAGCAATAG GTATGCTTAG GGAAGAGCTT GCGTCACATT AGTTAGTTGG TGGGGTAA
311.1
346.2 ...C.... .aa....G.....

311.5 TGGCCTACCA AGACGATGAT GTGTAGCCGG GCTGAGAGGT CGAACGGCCA CATTGGGACT GAGACACGGC CCAAACCTC
311.1
346.2 A..... .T..... T.....

311.5 CTACGGGAGG CAGCAGTAAG GAATTTTCGG CAATGGAGGA AACTCTGACC GAGCAATGCC GCGTGAACGA TGAAGTAT
311.1
346.2G.....C.....

311.5 TTCGGTACGT AAAGTTCITT TATTAGGGAA GAAAAGATGG TGGAAAAACC ATTATGACGG TACCTAATGA ATAAGCCC
311.1
346.2T.....T.A...AT...C...T.....

311.5 CGGCTAACTA TGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACATAGGGG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGTGGC
311.1
346.2

311.5 TAGGCGGTTA AATAAGTTTA TGGTCTAAGT GCAACGCTCA ACGTTGTGAT GCTATAAAAA CTGTTTAGCT AGAGTTGG
311.1
346.2T..... .A.....AA.....

311.5 ATAGAGGCAA GTGGAATTCC GTGTGTAGTG GTAAAAATCG TAAATATACG GAGGAACACC AGAAGCGAAG GCGGCTTG
311.1
346.2A.....T..... .T.....

311.5 CTGGGTCTTA ACTGACGCTG AGGCACGAAA GCGTGGGGAG CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCCTAAA
311.1
346.2T.....TG.....

311.5 CGATGAGTAC TAAACGTTGG ATAAAACCAG TGTTGAAGTT AACACATTAA GTACTCCGCC TGAGTAGTAC GTACGCAA
311.1
346.2G.....

311.5 GTATGAAACT TAAAGGAATT GACGGGACTC CGCACAAGCG GTGGATCATG TTGTTTAATT CGAAGGTACC CGAAAAAC
311.1
346.2

311.5 CTCACCAGGT CTTGACATGC TTTTGCAAAG CTGTAGAAAT ACAGTGGAGG TTATCAGAAAG CACAGGTGGT GCATGGTT
311.1
346.2C..... T..... .TT.....

311.5 GTCGTCAGCT CGTGTCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCC GC AACGAGCGCA ACCCTTGTG TTAATTGCCA TCATTAAG
311.1
346.2A... .G..A... G..CGT.A.....

311.5 T--TGGGGAC TTTAGCAAGA CTGCCAATGA TAAATTGGAG GAAGGTGGGG ACGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATG
311.1 .--.....
346.2 .GG..... .G.....

311.5 ACCTGGGCTA CAAACGTGAT ACAATGGCTG TTACAAAAGG TAGCTAAAGC GTAAGCTTCT GGCGAATCTC AAAAAAGC
311.1
346.2

311.5 AGTCTCAGTT CGGATTGAAG TCTGCAACTC GA
311.1
346.2

Obr. č. 6: Variabilita studovaných izolátů v sekvenci 16Sr RNA genu

(příklady typových sekvencí, 311/5, 311/1 – izoláty fytoplazmy stolburu (variabilní místo vyznačeno žlutě), 364/2 – izolát fytoplazmy žloutenky aster)

324.4	CITTTACCTA	TTTGCCGTGA	GTGGAAAGAA	CAAGGCCAAA	TCGGTAAACG	TAAACTTAAC	CITTTAACTA	GGGCTTTA
311.1
324.1
324.4	GCTTTAATTAT	TGTTTTGG	ACAAACTTTT	GGAATGATTC	AAAAACAAG	TGTTTCATTG	CCAGTTTGCT	TTTIGATC
311.1
324.1A.....	G.....
324.4	CCTTTAATG	CCGCTGCTGG	ATGTGCTATT	TTAATTTGGT	TTGCTGATTT	AATCAACTCT	CAAGGAATG	GTAATGGA
311.1
324.1G.....
324.4	ACTTCTAATT	TAAATATGTC	CTCAATGAGT	AATAATTTAA	TTGACTCTTT	AAAAGAAATA	AAACAAAATT	AATTACGAC
311.1
324.1
324.4	AATTTAATTA	CCAACAATTT	TGACCAAAAA	TTGCTAACAC	AATTTAATTT	AATATATCITA	GTATTGCTTT	TATTTTAA
311.1
324.1C.....
324.4	ATTGTAACIG	TGATTGTCCA	AATTGCTTCT	TTAAAAATAC	CAGTACAATA	CGCTCGCAAT	CAAAGTCCAT	CAAAAAGT
311.1
324.1A.....
324.4	AATAGTTATA	TCCCTTTTAA	AATTAACACT	GCTGGAGTAA	TGCCTGTAAT	TTTGGCAAAT	GCCITGATGC	AACCTTTC
311.1
324.1
324.4	AAAATGTTAA	TCCCAATAAT	TCAAATAAAT	CAAGGTTTTG	AGAATTTTGT	CAATTAATTA	ACTAATATTG	ACATCGTT
311.1
324.1A.....
324.4	AATTTGCTT	TGAGCTTGCA	TATTTAATTA	ATTATIGTTT	TTTCTTTTMT	CTTACTTTT	ATGAATGTTA	ATCCTGAA
311.1
324.1
324.4	GATATTTCCG	AGCAATTTATC	CAACAAGAT	GCCTATATTG	TTGGTTTAGA	CCAGGAGAAC	AAACAACGAA	ATAC
311.1
324.1

Obr. č. 7: Variabilita studovaných izolátů v sekvenci *Sec-Y* genu
(příklady typových sekvencí, modře zvýrazněna delece izolátu 311/1)

311.5 TCGGGTGAaG TCAGATAGAT TCTAATTTAA GTTGAACGCT AAATGAAACT TCTACTTCAC CAGCAAAATC TGGATGCG
311.1 ..G.C...A.G....

311.5 TTACTTTTGC GTTACTTTTG CTAGCATCAG TATTTAAAGT AATTGTAAAT CTATTTTGGT CTACATTTTG TAAATTAG
311.1G.... T..GT..... C..C.....

311.5 TATTTTFACT TAACATGCA GCTTTAACTG CAGCTTGAGT TCTTGCAITT AATTGACCTA ACTCTTTTTC TTTTAAIT
311.1A..G.....G

311.5 TTTGGCTTAA TGCTGGTTTT TCTACTGTTA CATTAGTAAA TACAACACTA CCTTGTGCTT TAGTAGAAIT TTGAGCCG
311.1..GC.T....T.....T....T.....T.....C.....GC.A.AA

311.5 CAGTAAGGGT TGCTTTTTTG TTGGTAGTAT CAAATCAAT TGTTCATCA GTATTACAG TTAATGAACC AGCTTGT
311.1 ...C.....A...C.AC...GT...A.....CC.....T.....

311.5 TTAAGAATTT ATTTAAAGCA TTTTGGTCTT TACTTGTAACT TTCTGCTTGT GTAACAGTAA TTGCTTTATT TTTATCAT
311.1T..C.G..GG.GTT.

311.5 CGTGTGTGAA AGTGTTTAAT GCTGGTTTT CTACTGTTAC ATTAGTAAAT ACAACATACT ACTTGTACTT TAGTAGAA
311.1 T---...T..T.....T.....T.....TA..-...G..C.....

311.5 TTTGGAGCCG CAGTAAGGGT TGCTTTTTCTT TCGTTAGCAT TAAATGTAAT TGTTCATCA GTACCTAAAG TCAATGTG
311.1

311.5 TCAGGTGTTT GTAAGAACTT ATTTACAGTC GCTTGGTTTT GAGTTGTAGA TTCGCTTGT GTAACAGTAA GTGCTTTA
311.1G..T.....T.....

311.5 TTTTATCAT CGTGTGTGAA AGTGTTTAAT AGTGGTTTT CTACTGTTAC TGTTCATTA GTAATACAA CATTATCA
311.1T.....

311.5 CCTTCTGCTT GAGTAGAAIT TGAGCCGCA GTAAGGGTTG CTTT-CTTTT CGTTAGCAIT AAATGTAAIT GTTACATC
311.1 ...GC...C T.....C.A.AA..C.....AT.G..G.CA.-...C.....

311.5 AGTACCTAAA GTCAATGTGT CAGGTGTTTG TAAGAACTTA TTTACAGTCG CTGGGGTTG AGTTGTAICT TCTGCTTG
311.1C.....AAC...C.....G..T.....GA.....

311.5 TGTAACAGTA ATTGCTTTAT TTTATCATC GTGTGTGAAA GTGCTTAAAT CTGGGTGAC TGATATTTGG TTA AAAAC
311.1G..C.G.TGG.GT T.T.....

311.5 AACTTCTGAG CCTGTTATTG TCCAACAACCT CTTTGCCACT GCTATTTTTA ATTCAGAAGT GCTGCTGTTA AACTAAT
311.1GC.....

311.5 ATTAACCATC TCTGAAGATA AATTTTGGCC AGTTTAACT ACTTTATTTA AACTGATG ATGATGAGGG TTTCTGCT
311.1G.....T.....

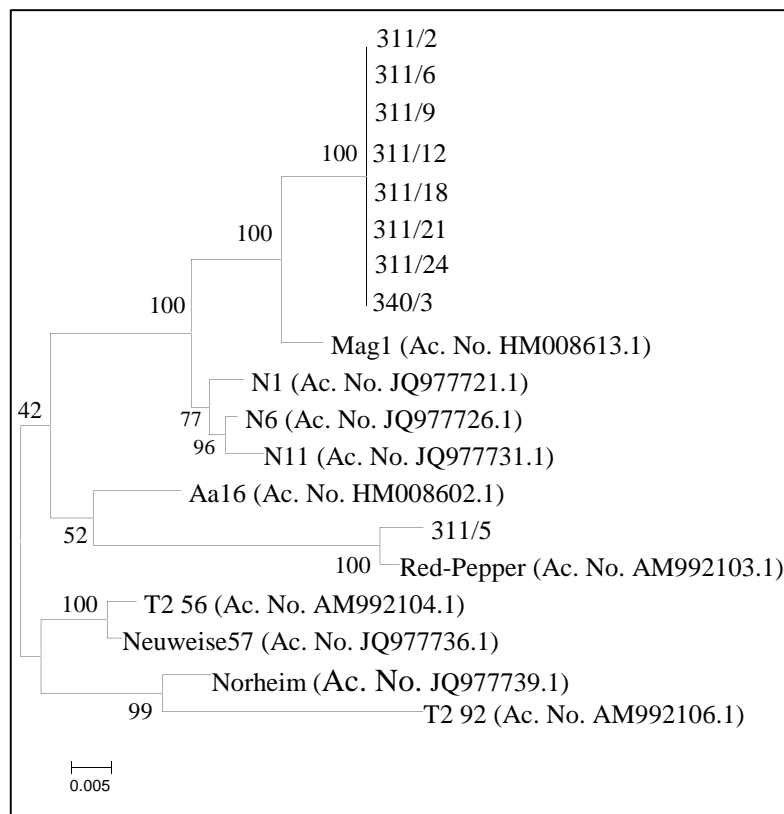
311.5 TTCTTCACTA GTTAAAATAA TCGTTGTATT TGTGTATTTT AACAACTAT TTAATTTGTC TATGGTTGAG GTGGTGTG
311.1C.....G.....C

311.5 TTCATATGTT ACTTTTCCCTT CCAAATTAGG AGCAGTTGTA CTGGCTGCAG CTACCAAATG TTTAGTTGAA GAGAAAGT
311.1 A.T.....G.....A.....CG.....C.....

311.5 CAAAACGACA TTGTTTAAATG ATCAATGGTG TTGA-TAGA- -TAGATTA
311.1-.....t...T....T T....---

Obr. č. 8: Variabilita studovaných izolátů v sekvenci *vmp1* genu

(příklady typových sekvencí)



Obr. č. 9: Dendrogram *vmp1* genu izolátů fytoplazmy stolburu sestavený pomocí neighbor-joining analýzy, Clustal.

(Jednotlivé vzorky jsou označeny názvem izolátu a Genbank Ac. No. (v závorce), úsečka znázorňuje procento nukleotidových substitucí)

6. DISKUZE

Fytoplazma stolburu způsobuje v České republice ekonomické ztráty na hospodářsky významných plodinách, jako jsou lilek rajče, paprika roční, miřk celer nebo réva vinná (Navrátil *et al.*, 2009). Většina poznatků o epidemiologii choroby je spojována s vektorem tohoto patogena, žilnatkou vironosnou (*Hyalesthes obsoletus*). V této práci byl studován další zástupce potenciálních vektorů, ostruhovník škvorový (*Dicranotropis hamata*). V souboru testovaných 41 jedinců byla fytoplazma stolburu (skupina 16SrXII-A) detekována v 9 případech, v jednom případě byla zjištěna přítomnost fytoplazmy žloutenky aster, skupiny 16SrI-F. Tato zjištění se podobají předchozím pozorováním na stejné lokalitě. Korbášová (2012) detekovala přítomnost fytoplazmy v *D. hamata* odchycených na potenciálně rezervoárových rostlinách, svlačci a kopřivě, na lokalitách jižní Moravy s vyšší průměrnou četností, fytoplazma byla přítomna u 65% testovaných jedinců. Na podobné lokalitě v Březí, byl ale výskyt nižší než průměr. V obdobném termínu byla infekčnost odlišná, při odchytu dne 30.6.2010 bylo na lokalitě detekováno 12,5 % infikovaných larev, 8 % infikovaných samců a pouze 1 ze 3 analyzovaných samic. Rozdíly mohou být způsobeny odlišným zastoupením jedinců, kdy Korbášová (2012) neanalyzovala téměř žádné samice, a odlišnou lokalitou a jejími odlišnými klimatickými a agrotechnickými podmínkami. Zjištěný výskyt fytoplazmy stolburu v *D. hamata* se ale podobá 35% četnosti výskytu infikovaných jedinců *Hyalesthes obsoletus* na lokalitě Perná v r. 2010 (Šafařová *et al.*, 2010).

Analýzou variability ribozomálních a neribozomálních genů byla zjištěna malá variabilita mezi izoláty stolburu získanými z *D. hamata* a z *H. obsoletus* na téže lokalitě. Všechny izoláty vykazovaly stejný RFLP Tuf profil, patřily k Tuf-b genotypu. Tento profil, označovaný také jako VK-II profil, je spojován s rezervoárovou rostlinou, na které byl vektor odchycen. VK-II je uváděný ve spojitosti s rostlinnými hostiteli svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*) a opletník plotní (*Calystegia sepium*). Profil VK-I je naopak spojován výhradně s kopřivou dvoudomou (*Urtica dioica*) (Langer *et Maixner*, 2004). Výsledky naznačují, že Tuf-a (VK-I) genotyp nemusí být pro kopřivu dvoudomou jedinečný, protože jedinci *H. obsoletus* byli odchyceni také na porostech kopřiv a proto se dá předpokládat, že sáli také na nich. Přítomnost fytoplazmy stolburu patřící ke genotypu Tuf-b (VK-II) v kopřivě dvoudomé potvrdili ve své práci i Fialová *et al.* (2009).

Analýza genu *SecY* umožnila rozdělení izolátů do dvou skupin. Tento gen byl úspěšně použit k rozlišení izolátů různých skupin fytoplazem, jako např. ze skupiny 16SrV - Flavescence dorée (Kuzmanovic *et al.*, 2008), 16SrI - fytoplazma žloutenky aster (Lee *et al.*, 2006) nebo 16SrX – skupiny proliferace jabloně (Danet *et al.*, 2007). V případě fytoplazmy stolburu umožnil rozlišení izolátů původem z různých hostitelských rostlin a různých zemí (Fialová *et al.*, 2009). Zjištěná variabilita izolátů z lokality Perná byla v souboru analyzovaných jedinců malá, nepodařilo se od sebe odlišit izoláty původem z různých hmyzích hostitelů. Důvodem může být malý počet analyzovaných izolátů.

Analýzou genetické variability *vmp1* genu byl zjištěn vyšší polymorfismus než u genů předchozích. Tento gen je proto považován za vhodný pro studium diverzity izolátů fytoplazmy stolburu (Pacífico *et al.*, 2009). V této práci se však nepodařilo od sebe jednotlivé izoláty odlišit, což mohlo být způsobeno nízkým počtem analyzovaných vzorků anebo jejich opravdu nízkou variabilitou v daném místě a čase. Fylogenetická analýza rozdělila zkoumané izoláty do dvou skupin. Početnější skupinu tvořily izoláty vykazující profil I (V2), které byly nejpříbuznější izolátu Mag1 z révy vinné. Tento profil je nejčastějším detekovaným v České republice (Fialová *et al.*, 2009) a bývá spojován s genotypem Tuf-b (Murolo *et al.*, 2010). Druhou skupinu tvořil izolát 311/5 z *H. obsoletus* sající na kopřivě, kterému náležel profil IV (V18) a vykazoval nejvyšší příbuznost s izolátem Red-Pepper z barvíčku růžového. *Vmp1* profil IV (V18) je nejčastěji spojován s rostlinnými hostiteli, jako jsou réva vinná (*Vitis vinifera*) a kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) (Fialová *et al.*, 2009). Ve studii Pacífico *et al.*, 2009 byla variabilita *vmp1* genu u izolátů z Francie a Itálie nižší. Tato skutečnost byla dána rozlohou zkoumané oblasti, která byla na jižní Moravě mnohem menší (Fialová *et al.*, 2009).

7. ZÁVĚR

V rámci své bakalářské práce jsem se věnovala molekulárně-biologické charakterizaci fytoplazmy stolburu, o které jsem vypracovala literární rešerši, ve které jsem shrnula současné poznatky o biologii a genetické variabilitě tohoto patogena.

V experimentální části jsem analyzovala soubor jedinců *Dicranotropis hamata* a *Hyalesthes obsoletus*, s cílem popsat variabilitu získaných izolátů fytoplazmy stolburu.

- V souboru 41 jedinců *Dicranotropis hamata* jsem detekovala přítomnost fytoplazmy u 22 % z nich. Fytoplazmu stolburu jsem identifikovala v šesti případech, tj. ve 14,6 %. V jednom případě jsem zjistila přítomnost fytoplazmy žloutenky aster (skupina 16SrI-F).
- Analýzou genetické variability izolátů fytoplazmy stolburu jsem potvrdila konzervativnost genu 16S rRNA, všechny izoláty vykazovaly 99% identitu s 16S rRNA sekvencemi fytoplazmy stolburu dostupnými v databázi GenBank.
- Všechny izoláty fytoplazmy stolburu náležely ke genotypu Tuf-b.
- Analýzou genetické variability neribozomálního genu *SecY* jsem zjistila minimální rozdíly mezi izoláty.
- Analýzou variability genu *vmp1* jsem zjistila převahu izolátů náležejících k profilu I (V2), jeden izolát náležel k profilu IV (V18).
- Fylogenetickou analýzou *vmp1* genu jsem zjistila, že většina izolátů fytoplazmy stolburu tvoří samostatnou větev, a vykazuje příbuznost s izolátem Mag1 původem z révy vinné, jeden izolát tvoří samostatnou větev a je nejpříbuznější s izolátem Red-Pepper z barvínku růžového.
- Nepodařilo se zjistit žádné významné rozdíly mezi jednotlivými izoláty fytoplazmy stolburu pocházejících z *Dicranotropis hamata* a *Hyalesthes obsoletus*.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Avramov, Z., Contaldo, N., Bertaccini, A., Sakaliev, D. (2011): First report of stolbur phytoplasma in *Prunus avium* in Bulgaria. *Bulletin of Insectology* 64: 71-72.
- Avramov, Z., Gillet, J., Laginova, M. (2008): First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) affected with grapevine yellows in Bulgaria. *Journal of Phytopathology* 156: 112-114.
- Bai, X. D., Zhang, J. H., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., Hogenhout, S. A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188: 3682-3696.
- Battle, A., Altabela, N., Sabaté, J., Laviña, A. (2007): Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species, by *Macrostelus quadripunctulatus*. *Annals of Applied Biology* 152: 235-242.
- Battle, A., Martínez, M. A., Laviña, A. (2000): Occurrence, distribution and epidemiology of Grapevine Yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 106: 811-816.
- Berger, J., Schweigkofler, W., Kerschbamer, C., Roschatt, C., Dalla Via, J., Baric, S. (2009): Occurrence of Stolbur phytoplasma in the vector *Hyalosthes obsoletus*, herbaceous host plants and grapevine in South Tyrol (Northern Italy). *Vitis* 48: 185-192.
- Bertaccini, A. (2007): Phytoplasma: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Blattny C., 1958. Bemerkungen zur Epidemiologie des Stolburs und der verwandten Krankheiten. *Proceedings of the 3rd Conference of Potato Virus Diseases*, Lisse, Wageningen 1957: 255-263.
- Březíková, M., Linhartová, Š. (2007): First report of Potato stolbur phytoplasma in hemiptera in southern Moravia. *Plant Protection Science*. 43: 73-76.

- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C., Foissac, X. (2009): Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 2951-2957.
- Danet, J. - L., Bonnet, P., Jarausch, W., Carraro, L., Skoric, D., Labonne, G., Foissac, X. (2007): Imp and secY, two new markers for MLST (multilocus sequence typing) in the 16SrX phytoplasma taxonomic group. *Bulletin of Insectology* 60: 339-340.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J-L., Šafárová, D., Foissac, X., Navrátil, M. (2009): Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia. *Journal of Plant Pathology* 91: 411-416.
- Firrao, G. (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.
- Korbášová, Z. (2012): Výskyt a variabilita fytoplazmy stolburu v *Hyalesthes obsoletus* a dalších potenciálních vektorech. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Kosljarova, V., Bojnansky, V. (1969): Contribution to the ecology of stolbur and stolburlike virus diseases. *Proceedings of the 6th Conference of the Czechoslovak Virologists, Olomouc 1967*: 216-221.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ermacora, P., Ferrini, F., Starović, M., Tosić, M., Carraro, L., Osler, R. (2008): Incidence and molecular characterization of flavescence dorée and stolbur phytoplasmas in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis* 47: 105–111.
- Langer, M., Maixner, M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43: 191-199.
- Lee, I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000): Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.

- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Bertacciny, A. (1998a): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 12: 1359-1366.
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bartoszyk, I. M. (1998b): 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., Hammond, R.W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, I. M., Zhao, Y., Bottner, K. D. (2006): *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20: 87–91.
- Lorenz K. H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E., (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Mori, N., Pavan, F., Bondavalli, R., Reggiani, N., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. (2007): Factors affecting the spread of “bois noir” disease in grapevine cv. Lambrusco in northern Italy. *Bulletin of Insectology* 60: 295-296.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., Romanazzi, G. (2010): Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2049-2059.
- Music, M. Š., Pusic, P., Fabre, A., Škoric, D., Foissac, X. (2011): Variability of stolbur phytoplasma strains infecting Croatian grapevine by multilocus sequence typing. *Bulletin of Insectology* 64: 39-40.
- Navrátil, M., Válková, P., Fialová, R., Lauterer, P., Šafářová, D., Starý, M. (2009): The incidence of stolbur disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). *Crop Protection* 28: 898–904.
- Pacifico, D., Alma, A., Bagnoli, B., Foissac, X., Pasquini, G., tessitori, M., Marzachi, C. (2009): Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* 6: 711-715.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Bianco, P. A., Wei, W., Casati, P., Durante, G., Davis, R. E. (2009): New 16Sr subgroups and distinct single nucleotide polymorphism lineages

- among grapevine Bois noir phytoplasma populations. *Annals of Applied Biology* 154: 279-289.
- Riedle-Bauer, M., Sara, A., Regner, F. (2008): Transmission of a stolbur phytoplasma by the Agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology* 156: 687-690.
- Riedle-Bauer, M., Tiefenbrunner, W., Otreba, J., Hanak, K., Schildberger, B., Regner, F. (2006): Epidemiological observations on Bois Noir in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg* 56: 177-181.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.
- Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Padieu, E. (1998): The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of Grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.
- Schneider, B., Gibb, K. S., Seemüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Razin, S., Tully, J. G. (eds.): *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. New York, Academic Press, pp. 369-380.
- Starý, M., Válková, P., Šafářová, D., Lauterer, P., Ackermann, P., Navrátil, M. (2013): Survey and molecular detection of Bois noir in vineyards of the Czech Republic. *Horticultural Science* (in print).
- Šafářová, D., Lauterer, P., Korbášová, Z., Starý, M., Válková, P., Navrátil, M. (2011): *Hyalesthes obsoletus*, a vector of stolbur phytoplasma: current situation in South Moravia, Czech Republic. *Bulletin of Insectology* 64: 127-128.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Valenta, V. (1953): Poznámky k bionomii, vývoju a hospodáskému významu Žilnatky vírusonosnej (*Hyalesthes obsoletus* Sign.) v Československu. *Zoologické a entomologické listy*, 267-282.

- Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., Zhao, Y. (2007): Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855-1867.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I. M., Shao, J., Suo, X., Davis, R. E. (2009): Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2582–2593.