

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2010**

**Romana Bukvová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genetická typizace fytoplazmy stolburu v patosystému  
révy vinné**

**Bakalářská práce**

**Romana Bukvová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Válová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr.  
Pavly Válové na základě uvedených literárních zdrojů.

Dne 25.4. 2010

Podpis .....

Chtěla bych poděkovat především RNDr. Pavle Válové za její odborné vedení mé bakalářské práce, za čas, který mi věnovala, i za pomoc při zpracování výsledků. Také bych chtěla poděkovat pracovníkům laboratoře na Katedře buněčné biologie a genetiky.

## Souhrn

Fytoplazmy jsou rostlinné patogeny, které byly objeveny v 60. letech minulého století. Jedná se o malé bakterie postrádající buněčnou stěnu, které parazitují v sítkovicích rostlin, u nichž způsobují výrazné škody.

Jedním z důležitých zástupců fytoplazem je i fytoplazma stolburu, která infikuje i révu vinnou (*Vitis vinifera* L.) a způsobuje u ní chorobu označovanou jako Bois noir. Tato choroba, jejímž vektorem je žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus* Signoret), patří mezi nejrozšířenější fytoplazmové choroby révy na území Evropy. Pro šíření onemocnění Bois noir má velký význam výskyt fytoplazmy stolburu v rezervoárových rostlinách. Genetická variabilita mezi jednotlivými izoláty lišícími se svou specifitou k rezervoárové rostlině a k vektoru byla odhalena díky molekulárním metodám (PCR a RFLP analýza), které umožňují amplifikovat konkrétní variabilní úsek fytoplazmové DNA.

Předložená bakalářská práce podává přehled o genetické variabilitě zjištěné u fytoplazmy stolburu na révě vinné na území Evropy, a to pomocí amplifikace genu *tuf* a *vmp1* genu, které vykazují diverzitu mezi stolburovými izoláty. Experimentální část byla zaměřena na detekci a především na genetickou typizaci fytoplazmy stolburu u příznakových rostlin révy vinné pocházejících z jižní Moravy. Genetická variabilita v genu *tuf* nebyla u stolburových izolátů zjištěna, zatímco *vmp1* gen poskytl dva odlišné profily, přičemž jeden z profilů nebyl na révě dosud zjištěn.

## Summary

Phytoplasmas are plant pathogens that were discovered in the 60<sup>th</sup> in past century. They are small bacteria lacking cell wall which parasitize plant sieves and cause significant damages.

One of the representative of phytoplasmas is Potato stolbur phytoplasma which infects grapevine (*Vitis vinifera* L.) and causes the disease known as Bois noir. This disease is transmitted by leafhopper (*Hyalosthes obsoletus* Signoret) and it is the most widespread disease among grapevine yellows in Europe. For the spread of Bois noir is also important the presence of stolbur phytoplasma in reservoir plants. Genetic diversity among isolates with different hostplant's and vector's specificity was detected by molecular methods (PCR and RFLP analyse) which allow amplification of specific phytoplasmas' DNA sequence.

This bachelor thesis gives an overview of the genetic variability found in bois noir phytoplasma in Europe by amplification of the *tuf* and *vmp1* genes which shows the variation among stolbur isolates. The experimental part was focused on the detection and especially genetic typing of stolbur phytoplasma in symptomatic grapevines from south Moravia. Genetic diversity in the *tuf* gene wasn't found, while the *vmp1* gene has provided two different profiles among stolbur isolates and one of the profiles was not detected in grapevine until now.

## Obsah:

<b>1</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Obecná charakteristika fytoplazem.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Interakce fytoplazem s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Příznaky fytoplazmové infekce .....</b>	<b>11</b>
<b>3.4</b>	<b>Klasifikace fytoplazem .....</b>	<b>12</b>
<b>3.5</b>	<b>Metody detekce fytoplazem .....</b>	<b>14</b>
<b>3.6</b>	<b>Fytoplazmy v patosystému révy vinné .....</b>	<b>14</b>
3.6.1	Patosystém révy vinné.....	15
3.6.2	Fytoplazmové choroby .....	15
3.6.2.1	Přehled fytoplazem infikujících révu vinnou.....	15
3.6.2.2	Bois noir.....	16
3.6.2.3	Flavescence dorée .....	17
3.6.2.4	Australian grapevine yellows.....	18
3.6.2.5	North-American grapevine yellows .....	18
3.6.2.6	Palatinate grapevine yellows.....	18
<b>3.7</b>	<b>Fytoplazma stolburu .....</b>	<b>18</b>
3.7.1	Taxonomie fytoplazmy stolburu.....	19
3.7.2	Hostitelské rostliny fytoplazmy stolburu.....	19
3.7.3	Vektorový přenos fytoplazmy stolburu na révě vinné.....	20
3.7.4	Příznaky choroby Bois noir .....	20
3.7.5	Geografické rozšíření Bois noir.....	22
3.7.6	Detekce fytoplazmy stolburu.....	22
3.7.6.1	PCR metody .....	22
3.7.6.2	RFLP analýza.....	25
<b>3.8</b>	<b>Genetická diverzita fytoplazmy stolburu.....</b>	<b>25</b>
3.8.1	Genetická variabilita <i>tuf</i> genu.....	26
3.8.2	Genetická variabilita <i>vmp1</i> genu .....	28
3.8.3	Genetická variabilita Bois noir izolátů v České republice.....	30
<b>3.9</b>	<b>Genetická variabilita fytoplazem z jiných taxonomických skupin.....</b>	<b>31</b>

<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>33</b>
4.1	Rostlinný materiál .....	34
4.2	Izolace celkové DNA .....	35
4.3	Měření koncentrace DNA, ředění vzorků .....	36
4.4	PCR reakce s univerzálními primery .....	37
4.5	Gelová elektroforéza nested-PCR produktů.....	38
4.6	RFLP analýza PCR produktů ribozomálního genu .....	39
4.7	Amplifikace neribozomálních úseků DNA pomocí nested-PCR .....	40
4.8	Gelová elektroforéza PCR produktů neribozomálních úseků .....	41
4.9	RFLP analýza neribozomálních úseků DNA .....	41
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	



# 1 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma Genetická variabilita fytoplazem stolburu s důrazem na variabilitu fytoplazem révy vinné. Experimentální část práce zahrnuje detekci fytoplazmy stolburu v odebraných vzorcích révy vinné pomocí molekulárních metod (izolace DNA, detekce fytoplazmy stolburu pomocí PCR a následná RFLP analýza) a genetickou typizaci izolátů stolburu pomocí neribozomálních genů (amplifikace neribozomálních úseků DNA a jejich štěpení pomocí RFLP reakce).

## 2 Úvod

Fytoplazmy, dříve nazývány mycoplasma-like organisms (MLOs), jsou jednoduché prokaryotní organismy, které řadíme do oddělení *Tenericutes*, do třídy *Mollicutes*. Jsou to obligátní intrabuněční parazité postrádající buněčnou stěnu, kteří přežívají a zároveň se množí ve floému rostlin a ve tkáních hmyzu.

Fytoplazmy mohou být přenášeny prostřednictvím hmyzího vektora, vegetativně (např. řízkováním), ale mohou být šířeny i prostřednictvím parazitických rostlin. Způsobují ekonomicky závažné choroby u mnoha planých a kulturních rostlin a vyskytují se téměř po celém světě. Z tohoto důvodu je velmi důležité výskyt fytoplazem pečlivě sledovat a hledat účinné prostředky k zabránění jejich šíření. Velký průlom ve výzkumu fytoplazem přinesly molekulární metody, a to především PCR reakce a RFLP analýza, pomocí nichž lze fytoplazmy snadněji detekovat a identifikovat.

Jednou z významných rostlin, která je těmito patogeny infikována i na našem území, je réva vinná. Fytoplazma infikující révu vinnou v Evropě a zároveň i v České republice je fytoplazma stolburu (Bois noir phytoplasma), jejímž vektorem je žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus* Signoret). Fytoplazma stolburu výrazně snižuje kvalitu i výnosy révy vinné, ale i jiných hospodářsky významných rostlin, jako jsou brambor, paprika, rajče, celer nebo lilek. Pro šíření fytoplazmy stolburu na révě vinné má velký význam výskyt této fytoplazmy v rezervoárových rostlinách (svlačec a kopřiva), ve kterých přečkává zimu a odkud je pomocí vektorů dále šířena.

V rámci Evropy, a to především na území Itálie, Francie nebo České republiky, byla zjištěna genetická variabilita mezi izoláty způsobující onemocnění Bois noir, které se lišily svou specifitou k hostitelské rostlině i k vektoru. Ke zjištění diverzity mezi izoláty fytoplazem pocházejících z různých rostlin se začaly využívat variabilní úseky fytoplazmové DNA, jako je *tuf*, *vmp1* a *secY* gen.

Experimentální část bakalářské práce zabývající se genetickou typizací fytoplazmy stolburu je součástí programu NAZV QH 71248 – „Detekce prokaryotických patogenů révy vinné a specifikace podmínek pro patogenezí jako předpoklad pro jejich účinnou regulaci“, jehož součástí je i výzkum fytoplazem v patosystému révy vinné v rámci České republiky.

### 3 Současný stav řešené problematiky

#### 3.1 Obecná charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou prokaryotní organismy postrádající buněčnou stěnu s variabilní velikostí od 200 do 800 nm, které mohou přežívat a rozmnožovat se pouze ve floému rostlin a v hemolymfě hmyzu (Bertaccini, 2007). Byly objeveny v roce 1967, kdy Dr. Doi a jeho spolupracovníci zjistili, že částice nacházející se ve floému rostlin postižených žloutenkou, jsou velice podobné příbuzným mykoplazmám. Do té doby se předpokládalo, že původci těchto chorob jsou viry (Lee *et al.*, 2000).

Fytoplazmy, které nemohou být pěstovány *in vitro* na kultivačních médiích, řadíme v současnosti do třídy *Mollicutes* zahrnující malé pleiomorfnní bakterie s jednoduchými membránami, které se odlišily od gram-pozitivních předků redukcí genomu a ztrátou vnější buněčné stěny (Hogenhout *et al.*, 2008). Fylogenetické studie předpokládají, že společným předkem fytoplazem je *Acholeplasma laidlawii* (Bertaccini, 2007).

Velikost genomu fytoplazem kolísá mezi 530 až 1350 kb (Marccone *et al.*, 1999). Genom fytoplazem obsahuje rovněž shluky opakujících se sekvencí nazývané potenciální mobilní jednotky (PMUs), které tvoří až 23 % repetitivních oblastí DNA (Bai *et al.*, 2006). Významným znakem genomu fytoplazem je rovněž nízký obsah C+G bází, a to jen v rozmezí asi 23 až 29 % (Kollar *et Seemüller*, 1989).

Redukce genomu u fytoplazem měla za následek ztrátu většiny metabolických drah, jako například dráhu pro ATP syntézu, pro syntézu aminokyselin a nukleotidů. Protože jsou fytoplazmy obligátní symbionti rostlin a hmyzu, vyžadují pro své rozšíření v přírodě oba tyto hostitele, z nichž získávají esenciální metabolity (Hogenhout *et al.*, 2008).

Fytoplazmy jsou spojovány s chorobami mnoha planých i kulturních rostlinných druhů (náležející do různých skupin) a způsobují celosvětově ekonomicky významné choroby, které se výrazně podílejí na snižování výnosů i kvality desítek zemědělských plodin. Vyskytují se prakticky po celém světě a byly hlášeny nejméně v 85 zemích světa (Lee *et al.*, 2000; Marzachi, 2006).

### 3.2 Interakce fytoplazmy s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem

Fytoplazmy mají široký okruh hostitelských rostlin a dosud byly identifikovány u více než 800 druhů rostlin (Lee *et al.*, 2000). V rostlinách se vyskytují nejčastěji ve floému, a to jak ve zralých sítkovicích, tak i v nezralých floémových buňkách (Hogenhout *et al.*, 2008). Mohou být většinou přenášeny několika druhy hmyzích vektorů, i když některé druhy mohou vykazovat vysokou specifitu ke svému vektoru a jsou přenášeny jen několika málo druhy nebo dokonce jen jedním jediným druhem (Christensen *et al.*, 2005).

Hlavní charakteristikou přenosu fytoplazmy z infikované rostliny na zdravou je schopnost hmyzu nasávat floémovou šťávu (Bertaccini, 2007). Během přenosu nastává tzv. doba latence, kdy je hmyzí vektor infikovaný, ale není schopný přenášet patogena do zdravých rostlin. Fytoplazmy během této doby kolují v těle hmyzu a množí se zde. Vektorem a alternativním hostitelem zároveň je bodavě savý hmyz – křísi, mery, popř. ploštice z řádu *Hemiptera* (Fialová, 2008).

Většina fytoplazem může být také přenášena parazitickými rostlinami, např. kokoticí (Bertaccini, 2007). Tento postup umožňuje přenést fytoplazmu na experimentální rostlinné hostitele, jako je barvínek růžový (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don; syn. *Vinca rosea* L., angl. periwinkle). Fytoplazmy se mohou šířit i vegetativním rozmnožováním, např. řízkováním nebo roubováním (Lee *et al.*, 2000).

### 3.3 Příznaky fytoplazmové infekce

Rostliny infikované fytoplazmou vykazují řadu příznaků, které odrážejí hluboké narušení normální hormonální rovnováhy v rostlině (Lee *et al.*, 2000). Symptomy zahrnují virescenci (rozvoj zelených květů a ztráta běžného květního pigmentu), fylodii, sterilitu rostlin, proliferaci výhonů, abnormální prodlužování internodií, zakrslost (malé rostliny i listy), chlorózy listů nebo výhonů, svinutku listů, metlovitost větví (witches' broom), odumírání větví a mimosezónní žloutnutí nebo červenání listů.

Obecně lze říci, že příznaky infekce mají jednoznačně negativní vliv na rostliny, ovšem tak, jako i k jiným bakteriálním infekcím, i vůči fytoplazmám jsou některé druhy

roślin tolerantní či rezistentní. Na své přenašeče většinou nemají fytoplazmy žádný negativní efekt, ve skutečnosti mohou zvýšit jejich plodnost a schopnost přežití (Lee *et al.*, 2000).

### 3.4 Klasifikace fytoplazem

Kvůli neschopnosti kultivovat fytoplazmy *in vitro* byly tyto organismy před nástupem molekulárních metod charakterizovány jen velmi nedostatečně. Obrovský převrat v identifikaci fytoplazem nastal na přelomu 80. a 90. let minulého století. Fylogenetická analýza pak potvrdila fytoplazmy jako definitivní zástupce třídy *Mollicutes* (Lee *et al.*, 2000).

Genetická variabilita fytoplazem v rámci vysoce konzervativní oblasti genu 16S rRNA dala základ prvním klasifikačním schématům na bázi metody délkového polymorfizmu restrikčních fragmentů (RFLP) úseku R16F2/R16R2 tohoto genu (Lee *et al.*, 1993). První klasifikační schéma dle Lee *et al.* (1993) zahrnovalo 9 skupin a 14 podskupin. Seemüller *et al.* (1998) rozdělili dosud známé fytoplazmy na základě fylogenetické analýzy sekvence 16S rRNA genu do 20 hlavních skupin. Lee *et al.* (1998b) poté své klasifikační schéma rozšířil na 18 skupin s více jak 50 podskupinami. Klasifikační schéma vytvořené na základě počítačem simulované RFLP analýzy fytoplazmové sekvence 16S rRNA rozlišuje až 28 skupin fytoplazem, kde každá skupina, respektive podskupina, je charakterizována referenčním izolátem (Wei *et al.*, 2007).

Každá skupina, které odpovídají jednotlivé podskupiny získané RFLP analýzou, představuje jeden druh fytoplazmy (Lee *et al.*, 1998b). Murray *et Schleifer* (1994) navrhli kategorii 'Candidatus', aby zajistili řádný zápis o případné skupině vzniklé na základě analýzy sekvencí 16S rDNA. Na základě této analýzy se v současnosti rozlišuje 15 skupin fytoplazem, v jejichž rámci byly navrženy provizorní druhy fytoplazem, tzv. 'Candidatus Phytoplasma' spp. (IRPCM, 2004). Tento status je fytoplazmám přiřazován podle přesně stanovených pravidel. Systematické řazení fytoplazem podle taxonomické komise z roku 2004 je uvedeno v Tab. 1.

**Tab. 1: Systematické zařazení fytoplazem podle sekvence genu pro 16S rRNA z roku 2004 (podle The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group, 2004, upraveno)**

Skupina 16Sr	Název skupiny	Druh ' <i>Candidatus Phytoplasma</i> '
16SrI	Aster yellows	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '
16SrII	Peanut witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '
16SrIII	X-disease	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' *
16SrIV	Coconut lethal yellows	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> ' *
		' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> ' **
		' <i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> ' **
		' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '
16SrV	Elm' yellows	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> ' *
		' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '
16SrVI	Clover proliferation	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '
16SrVII	Ash yellows	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '
16SrVIII	Loofah witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> ' *
16SrIX	Pigeon pea witches'-broom	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '
16SrX	Apple proliferation	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '
16SrXI	Rice yellows dwarf	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '
16SrXII	Stolbur	' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '
		' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' **
16SrXIII	Mexican periwinkle virescence	
16SrXIV	Bermudagrass white leaf	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '
16SrXV	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> ' group	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '

\* názvy druhů fytoplazem, které byly navrženy na X. International Congress of the International Organization of Mycoplasmaology v Bordeaux (1994), dosud však nebyly formálně přijaty

\*\* názvy navržené na IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team at the XIV International Congress Organization of Mycoplasmaology ve Vídni (2002) a dosud nejsou formálně používány

### 3.5 Metody detekce fytoplazem

Fytoplazmy je obtížné detekovat z důvodu jejich nízké koncentrace (speciálně v dřevinách) a nerovnoměrnému rozložení v pletivech infikovaných rostlin (Marzachi, 2006).

Jedny z prvních přístupů k detekci fytoplazem byly elektronová mikroskopie, barvení patogenních nukleových kyselin nebo roubování na indikátorovou rostlinu. V 80. letech byl velkým pokrokem v diagnostice fytoplazmových infekcí rozvoj molekulárních sond a mono- a polyklonálních protilátek. Jinými metodami k detekci byly ELISA testy, imunofluorescenční mikroskopie nebo DOT a Southern hybridizace s DNA sondami (Lee *et al.*, 2000).

V dnešní době je diagnostika fytoplazem běžně prováděna metodami PCR (polymerázová řetězová reakce) s následnou RFLP analýzou amplifikovaných DNA segmentů, které několikanásobně zvýšily citlivost detekce. Velkou konkurencí běžné PCR je v současné době tzv. real-time PCR, která umožňuje sledovat amplifikaci PCR produktu v reálném čase a nabízí možnost jak zvýšit počet testovaných vzorků a snížit tak čas i náklady. Tato metoda je však náročná na poměrně drahé přístrojové vybavení.

### 3.6 Fytoplazmy v patosystému révy vinné

Réva vinná je důležitou zemědělskou plodinou a tvoří velkou část rostlinné produkce České republiky. Fytoplazmy, které ji infikují, se v posledních letech staly hlavním předmětem studia rostlinných patogenů na různých hostitelských rostlinách v rámci České republiky (Navrátil *et al.*, 2009a; Příbylová *et al.*, 2009; Fránová *et al.*, 2009; Fialová *et al.*, 2009).

### 3.6.1 Patosystém révy vinné

Réva vinná (*Vitis vinifera* L.) je hospodářskou rostlinou, jejíž zralé plody se používají hlavně na výrobu vína, ale i k přímé konzumaci. Patří k nejstarším kulturním rostlinám pěstovaných člověkem. Révu řadíme do čeledi révovitých (*Vitaceae*), do třídy dvouděložných rostlin (*Magnoliopsida*).

V současné době se réva vinná prakticky pěstuje po celém světě v areálech s mírným podnebným pásmem (Buchtová *et al.*, 2000). Mezi nejvýznamnější pěstitele révy v Evropě patří státy jako Itálie, Řecko, Francie či Španělsko. V rámci České republiky se réva vinná pěstuje ve dvou vinařských oblastech – Čechy a Morava, které se dělí na další podoblasti.

Réva vinná se velkým významem podílí na rostlinné produkci jak v České republice, tak i v rámci celé Evropské unie. Trpí však celou řadou chorob, které snižují jednak její kvalitu, ale i výnosy. Mezi velmi rozšířené choroby révy patří plísně, kam řadíme plíseň révovou (*Botrytis cinerea*), plíseň šedou (*Plasmopara viticola*), zelenou hnilobu (*Penicillium expansum*) nebo padlí révové (*Uncinula necator*). Velké škody způsobuje rovněž černá skvrnitost révy (*Phomopsis viticola*) či červená spála révy (*Pseudopeziza tracheiphila*), které řadíme mezi houbové choroby. Svinutka (*Grapevine leafroll*) a infekční panašování listů (*Grapevine fanleaf*) jsou nemoci virového původu.

V posledních letech však nabývají velkého významu především choroby, za jejichž původce označujeme fytoplazmy.

### 3.6.2 Fytoplazmové choroby révy vinné

#### 3.6.2.1 Přehled fytoplazem infikujících révu vinnou

Žloutenky révy vinné jsou známy od 50. let 19. století a vyskytují se v mnoha oblastech po celém světě (Boudon-Padieu, 2003a). Vykazují velmi podobné příznaky, ale přesto se předpokládá, že každá je způsobena jinou, geneticky odlišnou, fytoplazmou.



K v současnosti nejdůležitějším fytoplazmám vinné révy řadíme především fytoplazmu zlatého žloutnutí révy a fytoplazmu stolburu. Révu však mohou infikovat i fytoplazmy ze skupiny žloutenky astry, žloutenky jilmu či fytoplazmy ze skupiny amerických žloutenek. Známé fytoplazmy infikující révu vinnou spolu se svým systematickým zařazením a místem výskytu jsou shrnuty v Tab. 2.

**Tab. 2: Přehled fytoplazem infikujících révu vinnou**  
(upraveno podle Boudon-Padieu, 2003a)

Název choroby	Označení fytoplazmy	Systematické zařazení fytoplazmy	Výskyt
Flavescence dorée	FD	16SrV-C, D	Itálie, Francie, Srbsko, Španělsko
Palatinate grapevine yellows	PGY	16SrV	Německo
Bois noir	Stolbur*	16SrXII-A	jižní a střední Evropa, Izrael
Australian grapevine yellows	‘ <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ’	16SrXII-B	Austrálie
Buckland valley grapevine	BVGY	16SrI-A	Austrálie
Grapevine yellows	Aster yellows**	16SrI-A	Itálie
North-American grapevine	Western X	16SrIII-I	USA

\* ‘*Ca. Phytoplasma solani*’

\*\* ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’

### 3.6.2.2 Bois noir

Choroba Bois noir spolu s chorobou Flavescence dorée patří k nejrozšířenějším fytoplazmovým chorobám vinné révy na území Evropy, a to především v jižních oblastech, jako je Itálie, Španělsko, Chorvatsko či Francie (Boudon-padieu, 2003a). Výskyt fytoplazmy stolburu na révě byl v České republice zaznamenán teprve v nedávné době.

Podrobnějšímu výkladu o fytoplazmě stolburu a onemocnění Bois noir se věnuje kapitola 3.7.

### 3.6.2.3 Flavescence dorée

Flavescence dorée je choroba, která byla mezi žloutenkami révy vinné popsána jako první, a to A. Caudwallem v roce 1957. Toto onemocnění způsobuje fytoplasma zlatého žloutnutí révy vinné (Flavescence dorée phytoplasma). Klasifikace vytvořená dle Lee *et al.* (2000) řadí tuto fytoplazmu do skupiny 16SrV (skupina žloutenky jilmu) a zahrnuje podskupinu C. Rozšířená klasifikace dle Lee *et al.* (2004) zahrnuje ještě další podskupinu D.

Onemocnění nejvíce postihuje vinice v jižní Francii, severní Itálii a ve Španělsku (Martini *et al.*, 1999). V posledních letech byl její výskyt zaznamenán také v Srbsku a Chorvatsku (Duduk *et al.*, 2003) nebo ve Švýcarsku (Jermini *et al.*, 2007). Listy napadených rostlin jsou tenčí a křehčí než normálně a jsou stočené dolů (Marccone *et al.*, 1996). Podél internodií se na listech objevují řady černých puchýřků, květy blednou a hrozny nedozrávají, vysychají nebo předčasně vadnou. Na listech se mimo jiné projevují i barevné anomálie. Ty vykazují zpravidla celé keře nebo jejich části (Růžička, 2008).

Flavescence dorée přímo souvisí s přítomností jejího zatím jediného známého vektora, kříška révového (*Scaphoideus titanus* Ball), který osídluje velké klimatické oblasti v Evropě (Boudon-Padieu, 2003a). Křísci jsou letově velmi aktivní, a mohou tak nákazu po celé vinici rozšířit za velmi krátkou dobu (EPPO, 2010).

### 3.6.2.4 Australian grapevine yellows (Australská žloutenka révy vinné)

S tímto onemocněním, zjištěným na území Austrálie a Nového Zélandu, jsou spojeny hned tři fytoplazmy: 'Ca. Phytoplasma australiense', Tomato big bud phytoplasma a Buckland valley grapevine yellows phytoplasma (Boudon-Padieu, 2003a).

'Ca. Phytoplasma australiense' patří do skupiny fytoplazmy stolburu, podskupiny B (16SrXII-B). Její vektor není doposud znám a nebyl zaznamenán ani její výskyt v Evropě.

Buckland valley grapevine yellows phytoplasma patří do skupiny fytoplazmy žloutenky astry, podskupiny A (16SrI-A). Přenašeč této fytoplazmy není znám, avšak

její výskyt byl zaznamenán i v Evropě, a to na území Itálie a Izraele. Epidemický výskyt této fytoplazmy na révě vinné nebyl zaznamenán, často však způsobuje smíšenou infekci spolu s jinými fytoplazmami (Boudon-Padieu, 2003a).

### **3.6.2.5 North-American grapevine yellows**

Toto onemocnění bylo zjištěno pouze v oblastech Severní Ameriky (Kanada, New York, Virginia) a způsobuje ho Virginia grapevine yellows fytoplasma náležející do skupiny X-disease (16SrIII-I). Přenašeč této fytoplazmy není dosud znám (Boudon-Padieu, 2003a).

### **3.6.2.6 Palatinate grapevine yellows**

Chorobu způsobuje Palatinate grapevine yellows fytoplasma ze skupiny 16SrV-A – ‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’, která je rozšířena především v Německu ve vinařské oblasti Palatinate a jejím přenašečem je *Oncopsis alni* Schrank (prstenovka olšová) z čeledi křískovitých (Boudon-Padieu, 2003a). Arnaud *et al.* (2007) fylogenetickou analýzou zjistili, že fytoplasma, která tuto chorobu způsobuje, tvoří spolu s fytoplazmou zlatého žloutnutí révy vinné stejnou větev a místem jejich původního výskytu je Evropa.

## **3.7 Fytoplazma stolburu**

Fytoplazma stolburu (Bois noir fytoplasma) je významným patogenem, který na révě vinné způsobuje závažné onemocnění označované jako Bois noir (BN). V Německu se pro toto onemocnění používá označení Vergilbungskrankheit (VK) a v Itálii Legno Nero (LN).

První zmínky o stolburové infekci (na bramboru) pochází ze 40. let z Ruska (Blatný *et al.*, 1956). První zástupci skupiny stolburu byli charakterizováni až po roce 1990 díky rozvoji molekulárně biologických metod (Navrátil *et Válová*, 2002).

### 3.7.1 Taxonomie fytoplazmy stolburu

Fytoplazmu způsobující onemocnění BN řadíme do domény *Bacteria*, kmene *Tenericutes* a třídy *Mollicutes*. Tato fytoplazma náleží dle klasifikace vytvořené Lee *et al.* (1998b), dle rozšířené klasifikace od Wei *et al.* (2007) i dle klasifikace Quaglino *et al.* (2009) do skupiny 16SrXII a podskupiny A. Taxonomická komise (IRPCM, 2004) navrhla pro tuto fytoplazmu provizorní označení 'Ca. *Phytoplasma solani*', které se běžně používá, avšak dosud není zcela v platnosti.

Vycházíme-li ze základní klasifikace dle Lee *et al.* (1998b), dělí se stolburová skupina na 2 podskupiny, zatímco rozšířená klasifikace dle Wei *et al.* (2007) vytvořená na základě počítačem simulované analýzy 16S rRNA dělí fytoplazmy ze skupiny stolburu na 5 podskupin, jež jsou zastoupeny referenčními izoláty. Rozdělení stolburové skupiny dle obou klasifikací je shrnuto v Tab. 3.

**Tab 3: Rozdělení skupiny fytoplazmy stolburu dle klasifikace vytvořené Lee *et al.* (1998b) a Wei *et al.* (2007)**

Název fytoplazmy	Lee <i>et al.</i> (1998b)	Wei <i>et al.</i> (2007)
Stolbur ('Ca. <i>Phytoplasma solani</i> ')	16SrXII - A	16SrXII - A
Grapevine yellows	16SrXII - A	
Celery yellows	16SrXII - A	
Phormium yellows	16SrXII - B	16SrXII - C
Strawbery yellows		16SrXII - C
'Ca. <i>Ph. australiense</i> '	16SrXII - B	16SrXII - B
'Ca. <i>Ph. japonicum</i> '		16SrXII - D
'Ca. <i>Ph. fragariae</i> '		16SrXII - E

Quaglino *et al.* (2009) klasifikační schéma ještě rozšířili na základě virtuální RFLP analýzy 16S rDNA sekvence o další dvě podskupiny - F a G, označované jako 'Ca. *Phytoplasma solani*'- related strains.

### 3.7.2 Hostitelské rostliny fytoplazmy stolburu

Fytoplazma stolburu infikuje celou řadu kulturních i plevelných rostlin a napadá asi 45 druhů rostlin z čeledi *Solanaceae* (lilkovitých) (EPPO, 2010).

Ekonomicky významnými hostiteli fytoplazmy stolburu je brambor, rajče, paprika, lilek a réva vinná. Dalšími hostiteli jsou například svlačec, tabák, celer nebo jahodník (Navrátil *et* Válová, 2002; Růžička, 2008). V případě onemocnění Bois noir jsou hlavními zdroji infekce rezervoárové rostliny, jako jsou kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a svlačec rolní (*Convolvus arvensis*), ve kterých fytoplazma přečkává zimu a ze kterých je poté přenášena pomocí vektora na ostatní rostliny (Pasquini *et al.*, 2007; Cimerman *et al.*, 2009).

### 3.7.3 Vektorový přenos Bois noir

Za nejvýznamnějšího vektora fytoplazmy stolburu je považována žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus* Signoret), která je i jediným vektorem onemocnění Bois noir (Sforza *et al.*, 1998; Lessio *et al.*, 2007).

Tento vektor je rozšířen po celé Evropě i na území Blízkého východu a rozsah jeho hostitelů je stále sporný. Za nejsevernější místo jeho výskytu se pokládá Německo a Polsko a Česká republika tvoří hranici rozšíření tohoto vektora (Březíková *et* Linhartová, 2007). Největší letová aktivita žilnatky je přibližně od půlky června do poloviny srpna (Bressan *et al.*, 2006).

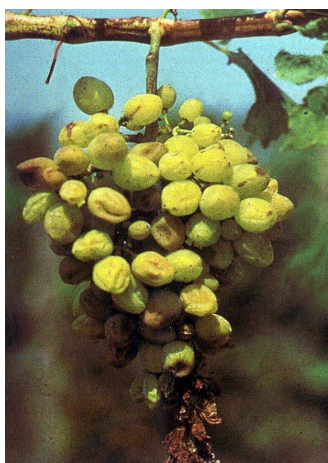
V nedávné době byl také zjištěn přenos stolburu na vinicích pomocí jiných druhů z čeledi cikádovitých, a to druhem *Reptalus panzeria* a *Reptalus quinquecostatus* (Palermo *et al.*, 2004; Trivellone *et al.*, 2005).

### 3.7.4 Příznaky choroby Bois noir

Příznaky stolburu na révě vinné jsou velmi podobné těm, které způsobuje fytoplazma zlatého žloutnutí révy vinné – viz předchozí kapitola 3.6.2.3. Symptomy této choroby se mohou projevit nejen na některých výhonech, ale také na celém keři (Červená *et* Nečekalová, 2007). Nejvýraznějším příznakem onemocnění BN na révě vinné je předčasné intenzivní zbarvení a skvrnitost listů. U bílých odrůd dochází ke žlutému zbarvení listů, zatímco u červených odrůd se listy zbarvují červeně až fialově. Listy jsou křehké a zasažené části listů nekrotizují. Velice často dochází

ke svinování listů. Letorosty a rovněž i internodia jsou slabší a kratší, u květů a plodů dochází nejčastěji k usychání a opadu květenství a bobule se scvrkávají (Růžička, 2008). Vybrané příznaky na infikovaných rostlinách jsou uvedeny na Obr. 1, 2 a 3.

Žilnatka vironosná upřednostňuje často i jiné hostitelské rostliny než samotnou révu vinnou. Šíření fytoplazmy stolburu je tedy na vinici pomalejší a infikovány jsou pouze jednotlivé rostliny (Červená *et* Nečekalová, 2007). I přesto, že hostitelské rostliny vykazují na konci vegetačního období (druhá polovina měsíce září) silné příznaky napadení fytoplazmou, je detekce fytoplazmy stolburu v odebraných rostlinách v této době velice nespolehlivá. Roli zde zřejmě hrají inhibiční látky, které amplifikaci fytoplazmové DNA a její následnou detekci znesnadňují (Ge *et* Maixner, 2003).



**Obr. 1:** Seschlé bobule (odrůda Chardonay).  
Foto [www.eppo.org](http://www.eppo.org)



**Obr. 2:** Červenání a svinování listů (odrůda Frankovka).  
Foto [www.chem.bg.ac.yu](http://www.chem.bg.ac.yu)



**Obr. 3:** Žloutnutí a svinování listů (odrůda Chardonay).  
Foto [www.eppo.org](http://www.eppo.org)

### 3.7.5 Geografické rozšíření Bois noir

Onemocnění BN je nejvíce rozšířeno na území Francie, Itálie, Německa, avšak bylo zjištěno i v jiných zemích, jako je Španělsko, Srbsko nebo Chorvatsko (Boudon-Padieu, 2003a). V nedávné době byl také zjištěn výskyt této choroby v Maďarsku (Kölber *et al.*, 2003), na Ukrajině (Milkus *et al.*, 2005), v Makedonii (Mitrev *et al.*, 2007) a v Bulharsku (Avramov *et al.*, 2008). V roce 2009 byl rovněž zaznamenán výskyt fytoplazmy stolburu na vinicích v Černé Hoře (Radonjić *et al.*, 2009).

V České republice byl výskyt fytoplazmy stolburu na révě vinné potvrzen až v roce 2006 na pěti lokalitách jižní Moravy (Červená *et Mikulková*, 2008).

### 3.7.6 Detekce fytoplazmy stolburu na révě vinné

Až do 90. let minulého století se k detekci fytoplazem používaly především metody založené na DNA hybridizaci. V současné době je pro včasnou detekci a identifikaci fytoplazem velmi důležitá metoda PCR s následnou RFLP analýzou PCR produktů.

#### 3.7.6.1 PCR metody

Polymerázová řetězová reakce je nejdůležitější molekulární metodou k detekci a identifikaci fytoplazem. Jednostupňová (někdy označovaná jako „direkt“) PCR reakce je však v mnoha případech nedostačující pro získání viditelných specifických bandů, a proto se často k detekci využívá dvojstupňová, tzv. nested-PCR.

#### Nested-PCR

Podmínkou nested-PCR je, aby primery užití při druhém stupni, byly umístěny uvnitř PCR produktu získaného při první amplifikaci (Fránová, 2008).

Prvním vodítkem k detekci a identifikaci fytoplazem je použití univerzálních a skupinově specifických primerů, které byly odvozeny od vysoce konzervativní oblasti

16S rRNA genu. Tyto sekvence jsou si u příbuzných fytoplazem velmi podobné, a proto byly další primery později odvozovány od sekvence 16S-23S rRNA genu (Smart *et al.*, 1996). Tato oblast vykazuje mezi jednotlivými fytoplazmami v porovnání se sekvencí genu 16S rRNA větší variabilitu. Univerzální primery používané pro detekci fytoplazem (základní jsou uvedeny v Tab. 4) však nejsou vhodné v případě, kdy chorobu způsobuje více jak jeden druh fytoplazmy nebo kdy je vektor nebo hostitelská rostlina napadena smíšenou infekcí (Lee *et al.*, 1994).

**Tab. 4: Univerzální primery pro detekci fytoplazem odvozené od sekvence ribozomálního 16S-23S rRNA genu**

Označení primeru	Sekvence primeru	Literatura	Velikost PCR produktu [bp]
P1	5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3'	Deng <i>et al.</i> (1991)	cca 1800
P7	5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3'	Schneider <i>et al.</i> (1995)	
F1	5' AAGACGAGGATAACAGTTGG 3'	Davis <i>et al.</i> (1993)	cca 1650
B6	5' TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG 3'	Padovan <i>et al.</i> (1995)	
F1	5' AAGACGAGGATAACAGTTGG 3'	Davis <i>et al.</i> (1993)	cca 1330
R0	5' GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC 3'	Lee <i>et al.</i> (1993)	
F2	5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3'	Gundersen <i>et al.</i> (1996)	cca 1200
R2	5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG 3'	Lee <i>et al.</i> (1993)	
fU5	5' CGGCAATGGAGGAAACT 3'	Lorenz <i>et al.</i> (1995)	cca 850
rU3	5' TTCAGCTACTCTTTGTAACA 3'	Lorenz <i>et al.</i> (1995)	

Skupinově specifické primery amplifikují konkrétní sekvenci DNA, která pokud je ve vzorcích detekována, určuje přímo skupinu fytoplazmy stolburu. Mezi skupinově specifické primery fytoplazmy stolburu patří např. fStol/rStol (Maixner *et al.*, 1995) či Stol11f2/r1 (Clair *et al.*, 2003). K identifikaci a detekci lze rovněž využít primery G35m/p, které amplifikují sekvence genu pro helikázu (Davis *et al.*, 1992). Primery StolFw/StolRev amplifikující genomickou DNA jsou skupinově specifické pro detekci fytoplazmy stolburu a proliferace jabloně (Galetto *et al.*, 2005), oproti tomu primery



R16(I)R1/F1 jsou specifické pro fytoplazmy ze skupiny žloutenky astry (16SrI), stolburu (16SrXII) a fylodie bobu (16SrII) (Lee *et al.*, 1994).

**Tab. 5: Skupinově specifické primery pro detekci fytoplazmy stolburu**

Primer	Sekvence primeru	Literatura	Velikost PCR produktu [bp]
fStol4	5' TTTAGCGATATTGGGAGAA 3'	Langer <i>et Maixner</i> (2004)	cca 1700
rStol4	5' ATCCTTGAATTCCTTGACG 3'		
G35p	5' TAACACTGTGGAAGCTCA 3'	Davis <i>et al.</i> (1992)	cca 1250
G35m	5' CGTCAATGGCTAATCGAT 3'		
Stol11F2	5' TATTTTCCTAAAATTGATTGGC 3'	Clair <i>et al.</i> (2003)	cca 900
Stol11R1	5' TGTTTTTGCACCGTTAAAGA 3'		
fStol	5' GCCATCATTAAGTTGGGGA 3'	Maixner <i>et al.</i> (1995)	cca 570
rStol	5' AGATGTGACCTATTTTGGTGG 3'		
StolFw	5' AACCGCTCGCAAACAGC 3'	Galetto <i>et al.</i> (2005)	cca 270
StolRev	5' ATTAGCGCCTTAGCTGTG 3'		

### Real-time PCR

Real-time PCR metoda byla vyvinuta pro zvýšení rychlosti a citlivosti detekce fytoplazem. Během real-time PCR je nárůst nově vytvořených produktů monitorován a detekován fluorescenčními metodami (TagMan sonda, barvivo SYBR Green) po každém proběhlém cyklu. V současnosti je tato metoda využívána především pro detekci fytoplazmy proliferace jabloně, Flavescence dorée fytoplazmy i Bois noir fytoplazmy (Galetto *et al.*, 2005; Angelini *et al.*, 2007; Hren *et al.*, 2007). Vývoj dalších detekčních systémů v rámci real-time PCR pro různé skupiny fytoplazem, včetně 16SrXII, pokračuje (Hodgetts *et al.*, 2009).

### Multiplex PCR

Při této modifikované PCR metodě je možno amplifikovat více jak jednu cílovou sekvenci s použitím několika párů primerů (Elnifro *et al.*, 2008), a tím tak

detekovat více fytoplazem současně. Při multiplex-PCR slouží každý amplifikovaný produkt zároveň jako vnitřní kontrola pro ostatní produkty (Edward *et* Gibbs, 1994).

Multiplex-PCR reakce může sloužit k současné detekci fytoplazem ze skupiny jilmu a fytoplazmy stolburu, pomocí níž lze ve vzorcích révy zároveň detekovat choroby FD a BN, které jsou velmi lehce zaměnitelné díky podobným příznakům, jež na rostlinách způsobují. Pro potřeby detekce a identifikace fytoplazem na révě vinné v České republice se v laboratořích Státní rostlinolékařské správy využívá multiplex PCR s primery fSTOL/rSTOL (Maixner *et al.*, 1995) a fB1/rUWS1 (Smart *et al.*, 1996) (Červená *et* Mikulková, 2008). V současnosti, v rámci zavádění metod real-time PCR, Terlizzi *et al.* (2009) využili modifikovanou metodu multiplex při použití real-time PCR se skupinově specifickými primery R16(I)F1/R1 a R16(V)F1/R1, která by mohla přinést velký pokrok v diagnostice chorob révy vinné.

### **3.7.6.2 RFLP analýza**

Tato metoda slouží k odlišení jednotlivých podskupin fytoplazem a využívá různé restrikční enzymy ke štěpení amplifikovaných DNA fragmentů. Nejčastěji užívanými enzymy používaných k RFLP analýze BN izolátů jsou *RsaI*, *AluI*, *MseI* nebo *HpaII*. Naštěpené produkty jsou následně separovány pomocí vertikální elektroforézy v akrylamidovém gelu nebo horizontální elektroforézy v agarózovém gelu, barveny ethidium bromidem a vizualizovány UV transluminátorem. Mutagenní a karcinogenní ethidium bromid je v poslední době nahrazován nekarcinogenními fluorescenčními barvivy GelRed<sup>TM</sup> nebo GoldView<sup>TM</sup>.

## **3.8 Genetická diverzita fytoplazmy stolburu způsobující onemocnění Bois noir**

Genetická variabilita u fytoplazem vznikla z důvodu překrývajících se území hlavních přenašečů a rostlinných hostitelů, což poskytlo fytoplazmám dostatek možností se mezi sebou navzájem ovlivňovat a vyměňovat si genetickou informaci. V důsledku

toho jsou skupiny fytoplazem zastoupeny členy, u kterých průběžně vznikly velké genetické rozdíly (Lee *et al.*, 1998a).

Sekvence 16S rDNA vykazuje nízkou genetickou variabilitu i v rámci izolátů stolburu pocházejících z různých oblastí a z různých hostitelských rostlin (Pacífico *et al.*, 2007). Rozdílné stolbuřové izoláty vykazují odlišnou velikost genomu a současně způsobují na rezervoárových rostlinách i jiné symptomy (Marccone *et al.*, 1999).

Variabilita v sekvenci 16S rRNA genu se ukázala být dostačující pouze pro odlišení jednotlivých skupin fytoplazem, případně podskupin, avšak není dostatečná pro rozlišení fytoplazem lišících se svou specifitou k vektoru nebo k hostitelské rostlině (Schneider *et al.*, 1997). Přitom studium genetické variability mezi jednotlivými izoláty je důležité k pochopení interakcí mezi rezervoárovými rostlinami a vektorem a k objasnění přirozeného cyklu fytoplazmy v přírodě a jejího šíření.

Pro určení diverzity v rámci podskupin fytoplazem se proto začaly hledat sekvence DNA, které by vykazovaly mnohem větší variabilitu. V případě fytoplazmy stolburu se ukazuje být výhodná amplifikace neribozomálních genů, jako je *tuf* gen (Schneider *et al.*, 1997), *vmp1* gen (Pacífico *et al.*, 2007), *secY* gen (Danet *et al.*, 2007) a *map* gen (Cimerman *et al.*, 2009).

### **3.8.1 Genetická variabilita genu *tuf***

Gen *tuf* kóduje elongační faktor Tu (EF-Tu) a hraje ústřední roli při translačních procesech (Schneider *et al.*, 1997).

Jako první se amplifikací genu *tuf* několika skupin fytoplazem (skupina žloutenky astry, stolburu, proliferace jabloně, žloutenky jilmu, X-disease a žloutenky jasanu) zabývali Schneider *et al.* (1997), kteří pro amplifikaci tohoto genu použili páry primerů *fTuf1/rTuf1*, *fTufi1/rTufi1*, *fTufi/rTufi*, *fTufAy/rTufAy* a *fTufu/rTufu*. K amplifikaci došlo pouze u izolátů ze skupiny žloutenky astry a stolburu a získané PCR produkty byly následně podrobeny i sekvenční analýze. Pár primerů *fTufAy/rTufAy* amplifikoval fragmenty o velikosti zhruba 940 bp. Výsledky RFLP a sekvenční analýzy vedly k navržení tohoto páru primerů, jakožto primerů pro specifickou amplifikaci fytoplazem ze skupiny žloutenky astry a skupiny stolburu. Tyto

výsledky nejenže poukázaly na skutečnost, že fytoplazmy z těchto dvou skupin si jsou nejvíce příbuzné, ale také na to, že *tuf* gen je mnohem více variabilní než 16S rRNA, a může tak sloužit k odlišení fytoplazem, které jsou jen těžko rozlišitelné na základě 16S rDNA.

Langer *et Maixner* (2004) zkoumali v rámci genu *tuf* genetickou variabilitu onemocnění Vergilbungskrankheit (VK) v Německu. Vzorky DNA byly brány z infikované révy vinné, svlačce, kopřivy a z vektora *Hyaesthes obsoletus* z různých vinařských oblastí. Na základě výsledků RFLP analýzy *Stol4* a *tufAy* fragmentů rozlišili tři typy fytoplazmy stolburu způsobující onemocnění VK. Typ VK-I (označovaný i jako Tuf-a) byl detekován na révě vinné, v přenašeči a v kopřivě a byl zjištěn ve všech vinařských oblastech kromě oblasti Franconia. Typ VK-II byl zjištěn rovněž ve všech vinařských oblastech na révě vinné a ve svlačci. Poslední typ VK-III byl identifikován pouze v oblasti Mosel na révě a ve svlačci. Tyto dva poslední typy spolu utváří pouze jednu skupinu VK-II (Tuf-b) vytvořenou na základě zjištěné fylogenetické příbuznosti. Z těchto výsledků vyplývá, že životní cyklus genotypu VK-I je spjat s kopřivou, zatímco životní cyklus typu VK-II je ve spojitosti s druhou rezervoárovou rostlinou fytoplazmy stolburu, svlačcem. Tento typ je i všeobecně více rozšířený.

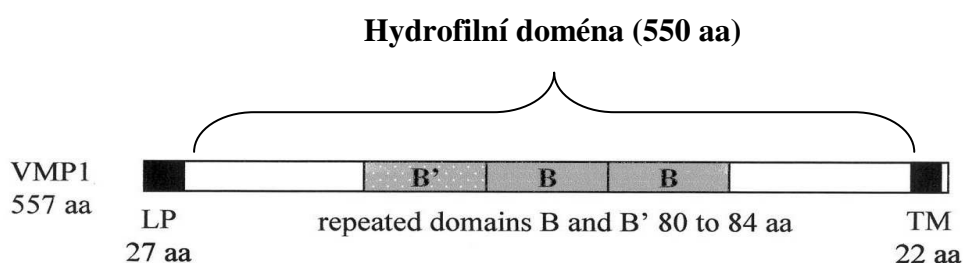
Pasquini *et al.* (2007) zjistili oba *tuf*-typy v révě vinné, v hmyzím vektoru i v rezervoárových rostlinách, přičemž pro nested-PCR reakci použili primery TufAyf2/TufAyr2, které navrhli na základě sekvence *tuf* genu získané z GenBank. Výskyt obou typů byl potvrzen ve střední i jižní Itálii, avšak s rozdílným zeměpisným umístěním.

V roce 2009 se genetickou variabilitou fytoplazmy stolburu na území Itálie zabývali Filippin *et al.* (2009), přičemž k analýze použili jednak gen *tuf*, jednak *secY* gen. PCR/RFLP analýzou genu *tuf* zjistili přítomnost obou *tuf*-typů, přičemž typ Tuf-b byl dominantním v jižní Itálii, zatímco v severní Itálii byly zastoupeny oba typy. Sekvenční analýzou *secY* genu bylo odhaleno 17 rozdílných genotypů. Deset z nich odpovídalo typu Tuf-a a sedm odpovídalo typu Tuf-b.

Ve stejném roce byl také zjištěn výskyt onemocnění BN na území Černé Hory (Radonjić *et al.*, 2009), kde 99 % izolátů révy vinné vykazovalo profil odpovídající typu Tuf-b a jen jediný vzorek révy vinné odpovídal druhému typu, tedy typu Tuf-a.

### 3.8.2 Genetická variabilita *vmp1* genu

*Vmp1* gen (variabilní membránový protein, dříve označovaný *Stol-1H10* gen) je specifický gen fytoplazmy stolburu, který kóduje membránový protein (Pacifico *et al.*, 2007, 2009). Jelikož fytoplazmy postrádají buněčnou stěnu a jejich životní cyklus zahrnuje v první fázi přilnutí a vniknutí do hostitelské buňky, hrají membránové proteiny hlavní roli v molekulárních mechanismech, jimiž se řídí interakce fytoplazma-hostitel (Cimerman *et al.*, 2009). V nedávné době se tedy začalo ke studiu genetické diverzity využívat variability i tohoto genu (viz. Obr. 4).



**Obr. 4: Struktura *vmp1* genu dle Cimerman *et al.* (2009), upraveno.**

**Legenda:** aa – aminokyselina, LP – terminační signál, Tm – transmembránový alfa helix, B, B' - opakující se domény

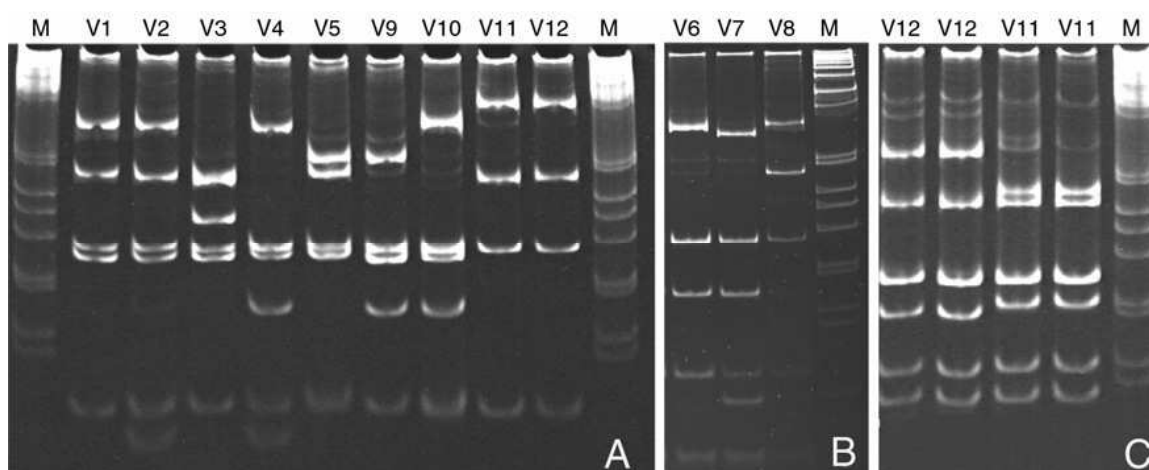
Cimerman *et al.* (2009) se zabývali charakteristikou *vmp1* genu a poukázali na jeho výraznou variabilitu v porovnání s geny *tuf*, *secY* a *map*. Při studiu zjistili, že *vmp1* gen je sekvence dlouhá zhruba 1 674 bp kódující protein o 557 aminokyselinách, který je homologní s VMPA genem *Mycoplasma agalactiae*. Kromě toho zjistili, že zralý *vmp1* protein má molekulovou hmotnost 57,8 kDa a je v membráně fytoplazem zakotven hydrofilním N-terminálním koncem, který ční ven z povrchu buňky. V této práci rovněž provedli Southern blot hybridizaci k určení lokalizace a počtu kopií tohoto genu v genomu fytoplazmových izolátů. Z výsledků usoudili, že *vmp1* gen byl na chromozomu fytoplazmy přítomen u všech analyzovaných izolátů v několika odlišných kopiích.

K určení variability *vmp1* genu mezi různými izoláty fytoplazmy stolburu použili PCR reakci spolu s RFLP analýzou, která odhalila 8 restričních profilů s rozdílnou velikostí fragmentů. Stejně izoláty však při analýze *tuf* genu poskytly pouze

dva rozdílné profily, přičemž všechny izoláty až na jednu výjimku vykazovaly restriční profil typu Tuf-b.

K porovnání variability *vmp1* genu také analyzovali geny *map* a *secY*. V případě *map* genu byly nalezeny pouze dva jednonukleotidové polymorfismy (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) odlišující se od referenčních izolátů, zatímco u více variabilního *secY* genu bylo nalezeno 8 SNPs. U *vmp1* genu přitom bylo při stejné analýze zjištěno 94 SNPs.

Pacifico *et al.* (2009) použili tento gen jako marker, aby zjistili genetickou diverzitu mezi izoláty BN na území Francie a Itálie. Segmenty kompletního amplifikovaného *vmp1* genu z infikované révy vinné, svlačce, kopřivy a žilnatky vironosné vytvořily fragmenty tří různých velikostí (1570 bp, 1820 bp a 2070 bp). Následná RFLP analýza pomocí *RsaI* rozdělila amplicony do dvanácti profilů, označené V1 až V12 (viz Obr. 5). Sedm restričních profilů (typů) bylo detekováno v izolátech révy vinné z Francie, přičemž nejhojněji se vyskytoval profil V1. Devět restričních profilů bylo detekováno v izolátech révy na území Itálie, kde 64 % všech izolátů tvořilo profil V3. Tento profil (V3) byl také zjištěn ve všech izolátech kopřivy a u 98 % izolátů žilnatky vironosné. Izoláty BN pocházející ze svlačce vykazovaly čtyři profily, přičemž nejhojnější byl profil V12.



**Obr. 5: Restriční profily *vmp 1* genu s použitím enzymu *RsaI* (*AluI*).**

**Legenda:** A + B – štěpení enzymem *RsaI*, C – štěpení enzymem *AluI*, M – marker molekulové hmotnosti 1-kb-plus DNA (Gibco BRL, Paislay, UK), V1 až V12 – restriční profily *vmp1* genu

Současně s analýzou *vmp1* genu byla ke srovnání genetické variability provedena i analýza *tuf* genu. Profily V3 a V5 byly unikátní pouze pro izoláty typu Tuf-a, zatímco všechny ostatní profily byly ve spojitosti s izoláty typu Tuf-b. Profil V1 byl přítomen u izolátů obou tuf typů.

Výsledky obou těchto prací tak potvrdily, že *vmp1* gen je dostatečně variabilní pro studium genetické variability mezi izoláty BN a vykazuje mnohem větší diverzitu ve srovnání s neribozomální sekvencí genu *tuf*.

Tesstori *et al.* (2009) zkoumali genetickou diverzitu *vmp1* genu na révě ve vinicích v Sicílii, přičemž většina rostlin révy vinné vytvořila restriční profil odpovídající profilu V1, zatímco profil V10 byl zjištěn pouze u jednoho izolátu révy vinné. Převaha profilu V1 tak potvrdila dřívější práci Pacifica *et al.* (2009), kde pro většinu izolátů révy vinné byl dominantní právě tento profil.

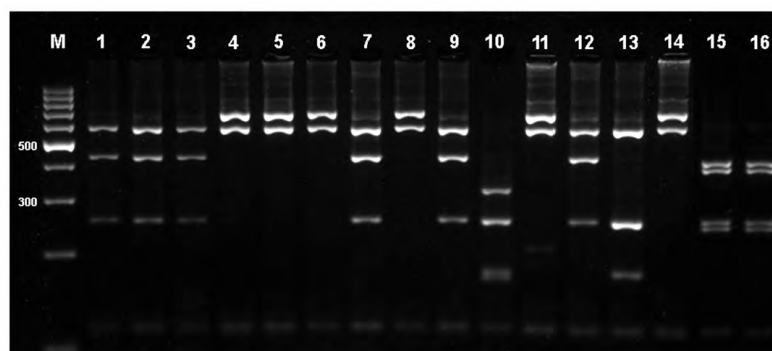
### 3.8.3 Genetická variabilita fytoplazmy stolburu v České republice

Genetickou variabilitou fytoplazmy stolburu v různých hostitelských rostlinách na jižní Moravě se zabývali Fialová *et al.* (2009). Tato práce je první, která zkoumá genetickou variabilitou v rámci jednoho regionu. Pro genetickou typizaci izolátů autoři použili neribozomální sekvence, a to variabilní *vmp1* gen, *tuf* gen a *secY* gen.

Příznakové rostliny (miřík celer, paprika, brambor, réva vinná, laskavec ohnutý, svlačec rolní, kopřiva dvoudomá atd.) pocházely ze zemědělských polí v okolí Lednice a ze dvou vinic na jižní Moravě.

*Tuf* gen byl amplifikován v nested-PCR reakci s primery Tuf1f/r a TufAyf/r, produkty byl štěpeny enzymem *HpaII*. Všechny produkty (o velikosti zhruba 940 bp) odpovídaly typu Tuf-b, jež uvádí Langer *et Maixner* (2004).

Pro amplifikaci *vmp1* genu byly použity nově navržené primery StolH10F1 a StolH10R1 pro direkt-PCR a pro nested-PCR pak TYPH10F a TYPH10R. Po naštipání enzymem daly produkty 5 rozdílných profilů označených římskými číslicemi I až V (viz Obr. 6). Nejčastějším profilem byl profil I, který byl zjištěn v 7 z 11 hostitelských rostlin. Na révě vinné z lokality Březí byl nalezen pouze profil IV.



**Obr. 6: Restrikční profily *vmp1* genu zjištěných na jižní Moravě.**

**Legenda:** M – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)  
 Profil I: 1 (svlačec), 2 (pcháč), 3 (svlačec), 7 a 9 (paprika), 12 (celer)  
 Profil II: 4 (opletník), 5, 6 a 8 (paprika), 11 a 14 (celer)  
 Profil III: 10 (brambor)  
 Profil IV: 15 (kopřiva) a 16 (réva vinná)  
 Profil V: 13 (celer)

Pro určení diverzity mezi izoláty byl také použit neribozomální gen *secY*, který kóduje translokační protein. Pro analýzu tohoto genu se použily izoláty ze všech tří lokalit a 5 referenčních izolátů získaných ze svlačce. Sekvenční analýza byla provedena pomocí primerů PosecF3 a PosecR3 (Fialová *et al.*, 2009), softwarových programů Phred, Phrap a Consed, a mnohočetné srovnání bylo provedeno pomocí ClustalW programu. Zatímco referenční izoláty poskytly 5 různých *secY* typů, z českých vzorků byly získány pouze dva typy sekvencí. Většina vzorků měla sekvenci shodnou se sekvencí referenčního izolátu pocházejícího z Francie.

### 3.9 Genetická variabilita fytoplazem z jiných taxonomických skupin

Genetická variabilita nebyla zjištěna pouze u fytoplazem ze skupiny stolburu, ale také u jiných taxonomických skupin.

Příkladem je variabilita mezi izoláty Flavescence dorée fytoplazmy (skupina 16SrV), kterou se zabývala Bertaccini (2007). Amplifikace a následná RFLP analýza ribozomálního proteinu (kódovaného geny *rpl22* a *rps3*) rozlišila 4 odlišné skupiny izolátů fytoplazem FD. Variabilita mezi izoláty pocházejících převážně z Francie a Itálie byla potvrzena i analýzou neribozomálního fragmentu FD9 kódujícího gen *secY*.



Arnaud *et al.* (2007) naopak analýzou genu *secY*, *degV* a *map* zjistili pouze tři různé skupiny izolátů.

Rovněž u fytoplazmy evropské žloutenky peckovin (European stone fruit yellows – ESFY, 'Ca. *Phytoplasma prunorum*', skupina 16SrX), která je významným patogenem ovocných stromů z rodu *Prunus*, byla nalezena variabilita mezi jednotlivými izoláty. Příznaky u napadených rostlin se v závislosti na druhu stromu a virulenci patogena projevují zcela odlišně nebo se dokonce nemusí projevit vůbec (Kison *et Seemüller*, 2001). Z tohoto důvodu se ke zjištění možné diverzity využívají variabilní oblasti genomu této fytoplazmy a to především geny *tuf*, *AceF*, *pnp*, *imp* či *SecY* gen (Danet *et al.*, 2007). Analýzou neribozomálního genu *tuf* u napadených stromů švestky na území Itálie byly odhaleny dva restriční profily fytoplazmy evropské žloutenky peckovin. První typ (označovaný „a“) se nelišil od referenčního izolátu, zatímco druhý typ „b“ identifikovaný u většiny stromů, byl typický pouze pro oblast Kalábrie a neshodoval se s žádným referenčním izolátem.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro detekci fytoplazmy stolburu (STOL) a její následnou genetickou typizaci bylo v měsíci září v roce 2009 odebráno 20 vzorků révy vinné z lokality v katastru obce Dolní Kounice na jižní Moravě (Česká republika). Všechny odebrané vzorky jevíly příznaky fytoplazmy stolburu, a to svinování a předčasné červenání listů a scrvkávání bobulí (Obr. 7, 8 a 9). Z lokality byly rovněž odebrány vzorky révy vinné z bezpříznakových keřů.

Jednotlivé úseky příznakových větví s listy (cca 20 cm) byly vloženy i s údaji o rostlině do igelitových sáčků a byly uchovány v ledničce při teplotě 4 °C do doby izolace DNA. Veškeré vzorky s uvedením odrůdy a jejich lokalizace na výsadbě jsou uvedeny v Tab. 4.



**Obr. 7:** Příznaková rostlina révy vinné (odrůda Modrý Portugal). Vlevo příznakový keř, vpravo zdravé rostliny. Foto Pavla Válová



**Obr. 8:** Slabší příznaky STOL na révě vinné (odrůda Modrý Portugal). Foto Pavla Válová



**Obr. 9:** Silné příznaky STOL na révě vinné (odrůda Modrý Portugal).  
Foto Pavla Válová

**Tab. 6: Přehled vzorků révy vinné z lokality Dolní Kounice**

Pořadové číslo	Odrůda révy vinné	Lokalizace*	Příznaky
1	Modrý Portugal	26/2/4 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
2	Modrý Portugal	38/3/1 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
3	Modrý Portugal	25/2/2 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
4	Modrý Portugal	25/1/7 Z	příznaky fytoplazmy stolburu**
5	Modrý Portugal	30/2/3 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
6	Modrý Portugal	49/1/2 P	příznaky fytoplazmy stolburu
7	Modrý Portugal	36/3/2 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
8	Modrý Portugal	48/1/6 P	příznaky fytoplazmy stolburu**
9	Modrý Portugal	36/2/3 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
10	Modrý Portugal	37/3/1 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
11	Modrý Portugal	41/1/2 Z	příznaky fytoplazmy stolburu**
12	Modrý Portugal	41/1/3 Z	příznaky fytoplazmy stolburu**
13	Modrý Portugal	41/1/1 Z	příznaky fytoplazmy stolburu**
14	Modrý Portugal	25/3/3 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
15	Modrý Portugal	26/2/1 P	příznaky fytoplazmy stolburu**
16	Modrý Portugal	27/1/1 P	příznaky fytoplazmy stolburu**
17	Zweigeltrebe	29/2/6 P	příznaky fytoplazmy stolburu
18	Modrý Portugal	25/4/6 Z	příznaky fytoplazmy stolburu
19	Modrý Portugal	26/1/2 P	příznaky fytoplazmy stolburu**
20	Zweigeltrebe	29/2/5 P	příznaky fytoplazmy stolburu
21	Zweigeltrebe	33/3/4 Z	bez příznaků

\* řada/pole/umístění keře v poli; Z = počítáno od konce řady; P = počítáno od začátku řady

\*\* zvláště silné příznaky – křehké, tmavě červenofialové listy s dolů svinutými čepelemi a scvrklé bobule

## 4.2 Izolace celkové DNA

Postup izolace vychází z modifikované CTAB-metody izolace fytoplazem dle Ahrense a Seemüllera (1992).

Pro homogenizaci vzorku bylo do třetí misky, umístěné na ledové tříšti, přidáno Pasteurovou pipetou cca 8 ml pracovního roztoku pufru Delaporta 1x, na špičku nože mořského písku a cca 1 g nakrájené horní části řapíku a centrální žilnatinu listů révy vinné.

Zhomogenizovaná směs byla slita do 30ml kyvety a jednotlivé kyvety byly vyváženy pufrem Delaporta 1x na předvážkách. Poté proběhla centrifugace při 1 000 g po dobu 4 minut a při teplotě 4 °C. Supernatant byl opatrně slit přes uhelon do čisté 30ml kyvety a jednotlivé kyvety byly opět vyváženy na předvážkách pufrem Delaporta 1x. Proběhla centrifugace při 14 000 g po dobu 25 minut a při teplotě 4 °C. Kyvety byly vyndány do ledové tříště, supernatant byl opatrně odstraněn a sediment byl resuspendován. Do kyvet se sedimentem bylo přidáno 2 ml roztoku Doyle-Doyle s merkptoethanolem (v poměru 500:1).

Vzorky byly přepipetovány do 10ml skleněných kyvet a ponechány 20 minut ve vodní lázni při teplotě 60 °C. Zkumavky byly přeneseny do hliníkového stojánu umístěného na ledové tříšti. Do každé kyvety bylo přidáno po 2 ml směsi chloroform-izoamylalkohol (v poměru 24:1).

Kyvety byly překryty inertním nepropustným materiálem (čtverečkem z gumových rukavic) a obsah byl opatrně promíchán převrácením. Poté byly zkumavky přeneseny do vodou vyvážených nosičů kyvet a následně proběhla centrifugace při 6 000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Pro každý vzorek byly nachystány 2 mikrozukavky typu Eppendorf (objem 1,5 ml) a řádně označeny. Do eppendorfek bylo napipetováno po 0,5 ml čiré vodné fáze (svrchní část kyvety).

Pro vysrážení DNA z vodné fáze byl do každé eppendorfky přidán 1 ml alkoholu izopropylnatého, zkumavky byly uzavřeny, promíchány převrácením (5krát) a přes noc byly umístěny do mrazáku při teplotě - 20 °C. Následující den byly mikrozukavky se vzorky centrifugovány při 18 000 g po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C. Supernatant byl vylit a sediment (malá čočka) byl promyt 1 ml 70% čistého ethanolu. Poté proběhla centrifugace zkumavek opět při 18 000 g po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci byl supernatant opatrně vylit a po okapání etanolu byly vzorky lyofilizovány ve vakuu na SPD SpeedVac po dobu 30 minut a při teplotě 45 °C. Vysušené vzorky byly uloženy v mrazáku při teplotě - 80 °C.

### 4.3 Měření koncentrace DNA, ředění vzorků

Lyofilizované vzorky izolované DNA byly rozpuštěny ve 100 µl deionizované vody. U všech vzorků byla změřena koncentrace DNA na nanodropu dle standardního postupu. Kvůli odstranění možných příměsí byly vzorky DNA přečištěny fenol:chloroformovou metodou (postup dle Tel-Zur *et al.*, 1999). Přečištěné vzorky byly znovu podrobeny měření koncentrace na nanodropu a údaje byly zaznamenány do Tab. 7. Dle zjištěné koncentrace byly vzorky DNA zředěny tak, aby do jedné PCR reakce byla použita DNA o koncentraci cca 50 - 100 ng/µl.

**Tab. 7: Naměřené hodnoty koncentrace DNA u vzorků a jejich ředění**

Pořadové číslo	Č. izolace DNA	Koncentrace před přečištěním [ng/µl]	Poměr $A_{260}/A_{280}$ před přečištěním	Koncentrace po přečištění [ng/µl]	Poměr $A_{260}/A_{280}$ po přečištění	Ředění izolované DNA
1	3604	362	1,6	518	2,0	10x
2	3605	270	1,4	352	2,1	7x
3	3606	512	1,5	260	2,1	5x
4	3607	222	1,2	379	1,8	7x
5	3608	617	1,4	154	2,1	3x
6	3609	890	1,4	333	2,0	7x
7	3610	471	1,5	435	2,0	8x
8	3611	555	1,4	141	2,1	3x
9	3612	357	1,4	156	2,1	3x
10	3613	447	1,3	367	2,0	7x
11	3614	537	1,3	154	2,1	3x
12	3615	429	1,3	88	2,0	2x
13	3616	1293	1,2	179	2,0	3x
14	3617	857	1,2	117	2,1	3x
15	3618	562	1,5	431	2,0	8x
16	3619	211	1,6	192	2,0	3x
17	3620	307	1,5	356	2,0	7x
18	3621	269	1,7	297	2,0	6x
19	3622	237	1,6	488	2,0	8x
20	3623	437	1,7	236	2,1	4x
21	3631	485	1,5	212	2,1	4x

#### 4.4 PCR reakce

Pro detekci fytoplazmy stolburu byla použita metoda nested-PCR s užitím univerzálních ribozomálních primerů R16F1/R16R0 (Davis *et Lee*, 1993; Lee *et al.*, 1993) a R16F2/R16R2 (Gundersen *et Lee*, 1996; Lee *et al.*, 1993). Složení použitých primerů je uvedeno v Tab. 8.

Pro PCR reakci byla nejprve připravena reakční směs, tzv. „premix“, a to smícháním jednotlivých položek uvedených v Tab. 9. Premix byl promíchán, krátce stočen na minicentrifuze a následně byl rozpipetován do označených 0,2 ml mikrozkušavek, kam byl poté napipetován i vzorek. Zkušavky s premixem a se vzorky byly opět krátce stočeny na minicentrifuze. Jako negativní kontrola reakce sloužil vzorek DNA odebraný ze zdravé rostliny. Jako slepý vzorek reakce (blank) byla použita mikrozkušavka, kde bylo k premixu nepipetováno místo vzorku DNA 2 µl deionizované vody. Mikrozkušavky byly umístěny do termo-cykléru, kde proběhla PCR reakce dle stanovených podmínek uvedených v Příloze 2.

Po skončení direkt PCR byly PCR produkty ředěny 40krát deionizovanou sterilní vodou. Postup nested-PCR byl stejný jako u prvního stupně PCR, byly však použity primery R16F2 a R16R2. Jako pozitivní kontrola PCR reakce sloužil vzorek DNA z *Vinca rosea* č. 3770 (izolát AP), který obsahoval fytoplazmu proliferace jabloně.

Pipetování jednotlivých složek směsi i vzorků bylo prováděno na ledové tříšti ve flow-boxu.

**Tab. 8: Složení použitých primerů**

Primer	Sekvence primeru	Literatura	Velikost PCR produktu [bp]
<b>R16F1</b>	5' AAGACGAGGATAACAGTTGG 3'	Davis <i>et Lee</i> (1993)	cca 1330
<b>R16R0</b>	5' GGATACCTTGTTACGACTTAACCCC 3'	Lee <i>et al.</i> (1993)	
<b>R16F2</b>	5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3'	Gundersen <i>et Lee</i> (1996)	cca 1200
<b>R16R2</b>	5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG 3'	Lee <i>et al.</i> (1993)	

**Tab. 9a: Složení 20ml reakční směsi pro PCR reakci s primery R16F1/R0**

Položka	Konečná koncentrace	Množství roztoku na 1 reakci [μl]
Pufr	1 x	2
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mmol.l <sup>-1</sup>	1,2
Voda		11,3
dNTP	100 μmol.l <sup>-1</sup>	2
f primer (R16F1)	0,25 μmol.l <sup>-1</sup>	0,25
r primer (R16R0)	0,25 μmol.l <sup>-1</sup>	0,25
Red Taq polymeráza	1U/reakce	1
<b>Objem premixu (1 reakce)</b>		<b>18 μl</b>
<b>Objem vzorku (1 reakce)</b>		<b>2 μl</b>
<b>Celkový objem reakce</b>		<b>20 μl</b>

**Tab. 9b: Složení 25ml reakční směsi pro PCR reakci s primery R16F2//R2**

Položka	Konečná koncentrace	Množství roztoku na 1 reakci [μl]
Pufr	1 x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mmol.l <sup>-1</sup>	1,5
Voda		14,875
dNTP	100 μmol.l <sup>-1</sup>	2,5
f primer (R16F2)	0,25 μmol.l <sup>-1</sup>	0,3125
r primer (R16R2)	0,25 μmol.l <sup>-1</sup>	0,3125
Red Taq polymeráza	1U/reakce	1
<b>Objem premixu (1 reakce)</b>		<b>23 μl</b>
<b>Objem vzorku (1 reakce)</b>		<b>2 μl</b>
<b>Celkový objem reakce</b>		<b>25 μl</b>

## 4.5 Gelová elektroforéza nested-PCR produktů

Pro gelovou elektroforézu nested-PCR produktů R16F2/R2 byl připraven 1,5% agarózový gel v TAE pufru. 45 ml rozvařeného gelu bylo přelito do kádinky a bylo do něj přidáno 4,5 μl fluorescenčního barviva GelRed<sup>TM</sup>. Pro horizontální elektroforézu byla připravena vanička o velikosti 10 x 10 cm, do které byly pod sebe vsazeny dva 18-ti jamkové hřebínky (z důvodu většího počtu vzorků).

Gel byl nalit do vaničky a nechal se ztuhnout (cca 30 minut). Po ztuhnutí byly z gelu opatrně vyjmuty hřebínky, gel byl přenesen do elektroforetické komůrky a převrstven TAE pufrem.

Do jamek gelu bylo jako první pipetováno 1,8 μl standardu molekulové hmotnosti, poté bylo pipetováno po 4,5 μl jednotlivých PCR produktů.

Elektroforéza byla zapojena na 70 V. Po skončení elektroforézy (cca 45 minut)

byl gel opláchnut destilovanou vodou, poté byl gel pozorován UV transluminátorem a byla provedena fotodokumentace.

#### 4.6 RFLP analýza PCR produktů

Pozitivní produkty nested-PCR byly podrobeny RFLP analýze. Nejprve byla připravena reakční směs, a to smícháním položek uvedených v Tab. 10, a ke štípání PCR produktů byly použity restriční endonukleázy *RsaI* a *MseI*, přičemž byly dodrženy instrukce dodávající firmy. K reakční směsi byl napipetován vzorek a vše bylo krátce stočeno na minicentrifuze. Poté byla reakční směs zakápnuta kapkou minerálního oleje a zkumavky byly umístěny do termoblotu, kde proběhla inkubace přes noc (asi 16 hodin) při teplotě 37 °C.

**Tab. 10: Složení reakční směsi RFLP analýzy pro 1 reakci**

Položka	Objem [μl]
Pufr	1,2
BSA 10x	1,3
Voda	0,8
Restriční enzym*	0,2
Vzorek DNA	<b>9,0</b>
<b>Celkový objem reakce</b>	<b>12,5</b>

\* *RsaI* nebo *MseI*

Po inkubaci v termoblotu byly produkty analýzy separovány na horizontální gelové elektroforéze. Příprava gelu je obdobná jako v předchozí kapitole, výjimkou bylo použití 2,5% Metaphoragarózy v TBE pufru a TBE pufru v elektroforetické komůrce. Před nanesením bylo ke každému vzorku přidáno 2 μl vzorkovacího roztoku. Standard molekulové hmotnosti byl nanesen jako první (1,8 μl) a poté bylo naneseno po 5 μl kontroly a jednotlivých produktů. Elektroforéza byla zapojena na 50 V a poté byla provedena fotodokumentace.



## 4.7 Amplifikace neribozomálních úseků DNA pomocí nested-PCR

Pro amplifikaci neribozomálních úseků DNA (*vmp1* gen a *tuf* gen) byly brány pouze vzorky, u kterých byl prokázán výskyt fytoplazmy stolburu, tak jak je uvedeno v Tab. 13. Amplifikace genu *vmp1* byla provedena nested-PCR s použitím párů neribozomálních primerů StolH10F1/StolH10R1 a TYPH10F/TYPH10R (Pacifico *et al.*, 2009; Fialová *et al.*, 2009). Pro 2. stupeň amplifikace byl rovněž použit pár primerů StolH10F2/R2 (Pacifico *et al.*, 2009), které amplifikují větší úsek *vmp1* genu. Pro nested-PCR genu *tuf* byly použity páry neribozomálních primerů fTuf1/rTuf1 a fTufAy/rTufAy (Schneider *et al.*, 1997).

Postup PCR byl stejný jako v kapitole 4.4, reakce však proběhla za stanovených podmínek uvedených v Příloze 3. Pro nested-PCR byl PCR produkt naředěn 5krát a reakce proběhla v termo-cykléru dle stanovených podmínek uvedených v Příloze 4.

**Tab. 11: Složení 25ml reakční směsi pro první a druhý stupeň PCR**

Položka	Konečná koncentrace	Množství roztoku na 1 reakci [μl]
Pufr	1 x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mmol.l <sup>-1</sup>	1,5
Voda		12
dNTP	200 μmol.l <sup>-1</sup>	5
f primer*	0,4 μmol.l <sup>-1</sup>	0,5
r primer**	0,4 μmol.l <sup>-1</sup>	0,5
Red Taq polymeráza	1U/reakce	1
<b>Objem premixu (pro 1 reakci)</b>		<b>23 μl</b>
<b>Objem vzorku (pro 1 reakci)</b>		<b>2 μl</b>
<b>Celkový objem reakce</b>		<b>25 μl</b>

\* pro *tuf* gen = fTuf1 a fTufAy (2.stupeň)

pro *vmp1* gen = StolH10F1; TYPH10F a Stol10F2 (2. stupeň)

\*\* pro *tuf* gen = rTuf1 a rTufAy (2. stupeň)

pro *vmp1* gen = StolH10R1; TYPH10R a Stol10R2 (2. stupeň)

**Tab. 11: Složení použitých primerů**

Primer	Sekvence primeru	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
fTuf1	5' CACATTGACCACGGTAAAAC 3'	cca 1080	Schneider <i>et al.</i> (1997)
rTuf1	5' CCACCTTCACGAATAGAGAAC 3'		
fTufAy	5' GCTAAAAGTAGAGCTTATGA 3'	cca 950	Schneider <i>et al.</i> (1997)
rTufAy	5' CGTTGTCACCTGGCATTACC 3'		
StolH10F1	5' AGTTTGTAATAATCTTTTATGT 3'	cca 1850	Pacífico <i>et al.</i> (2009)
StolH10R1	5' GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC 3'		
StolH10F2	5' TGTCACAGGGAAACAGACAG 3'	cca 1800	Pacífico <i>et al.</i> (2009)
StolH10R2	5' CACAAACATGATGATTATCAACGA 3'		
TYPH10F	5' AACGTTTCATCAACAATCAGTC 3'	cca 1450	Fialová <i>et al.</i> (2009)
TYPH10R	5' CACTTCTTTCAGGCAACTTC 3'		

#### 4.8 Gelová elektroforéza nested-PCR produktů neribozomálních úseků

Průběh separace PCR produktů byl stejný jako v kapitole 4.5.

#### 4.9 RFLP analýza neribozomálních úseků DNA

Pozitivní produkty PCR uvedené v Tab. 13 byly podrobeny RFLP analýze. Postup RFLP analýzy byl stejný jako v kapitole 4.6, přičemž reakční směs byla připravena smícháním položek v Tab. 12 a jako restriční endonukleázy byl použit enzym *RsaI* pro *vmp1* gen a enzym *HpaII* pro *tuf* gen.

**Tab. 12: Složení reakční směsi RFLP analýzy pro 1 reakci**

Položka	Objem [μl]
Pufr	4
Voda	5,8
Restriční endonukleáza*	0,2
Vzorek DNA	10
<b>Celkový objem reakce</b>	<b>20</b>

\* pro *vmp1* gen = *RsaI*, pro *tuf* gen = *HpaII*

Produkty RFLP analýzy byly opět separovány na horizontální gelové elektroforéze při použití 2,5% Metaphoragarózy a TBE pufru. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek číslo 3564 – fytoplazma stolburu na révě vinné z lokality Perná. Přesný postup gelové elektroforézy je popsán v kapitole 4.6.

Přístroje a chemikálie používané v experimentální části bakalářské práce jsou uvedeny v Příloze 1.

## 5 Výsledky

Veškeré výsledky detekce fytoplazmy stolburu a její genetické typizace jsou přehledně uvedeny v Tab 13.

Z dvaceti vzorků DNA příznakových rostlin byl zaznamenán pozitivní výsledek nested-PCR reakce s univerzálními primery F1/R0 a F2/R2 u 8 vzorků rostlin (Obr. 10). Pozitivní PCR produkty o velikosti cca 1200 bp a pozitivní kontrola AP – fytoplazma proliferace jabloně č. 3770 se stejnou velikostí PCR produktu, byly štěpeny restričními endonukleázami *RsaI* a *MseI* (Obr. 11). Porovnáním restričních spekter těchto produktů s kontrolními spektry RFLP analýzy a F2/R2 restričními profily (Lee *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2007; Quaglino *et al.*, 2009) byl potvrzen výskyt fytoplazmy stolburu - 16SrXII, podskupiny A - u všech pozitivních rostlin. U pozitivní kontroly (AP) byl potvrzen výskyt fytoplazmy proliferace jabloně. Všechny pozitivní vzorky byly odebrány z keřů v okrajových částech polí.

Při gelové elektroforéze nested-PCR produktů *vmp1* genu s primery TYPH10F/R jsme získali PCR produkty, všechny o stejné velikosti cca 1450 bp, u tří rostlin (Obr. 12). Následná RFLP analýza amplifikovaných segmentů tohoto genu pomocí *RsaI* a porovnání restričních spekter se spektry kontrolních vzorků ukázala u našich vzorků variabilitu získaných restričních profilů (Obr. 16). Vzorek 3607 poskytl profil s bandy o velikosti cca 700 a 600 bp, zatímco vzorky 3621 a 3622 poskytl profil s bandy o velikosti 600 a 450 bp. U pozitivní kontroly (vzorek 3564, fytoplazma stolburu) byl identifikován profil s bandy o velikosti 400, 250 a 120 bp. Při použití primerů StolH10F2/R2 jsme získali PCR produkty (o velikosti cca 1850 bp) u stejných vzorků (Obr. 13) a RFLP analýzou byly získány opět dva odlišné restriční profily. Vzorky 3621 a 3622 vykazovaly profil s velikostmi bandů cca 800, 450, 300 a 280 bp a vzorek 3607 poskytl profil s bandy o velikosti cca 800, 300, 100 a 50 bp (Obr. 16).

V případě *tuf* genu byly zaznamenány pozitivní výsledky u celkem pěti vzorků rostlin révy vinné – 3607, 3619, 3620, 3621 a 3622 (Obr. 14). U všech těchto vzorků, o velikosti bandu cca 940 bp, byl RFLP analýzou s použitím *HpaII* a následným porovnáním restričních spekter se spektry kontrolních vzorků zjištěn stejný restriční profil s bandy o velikosti 650 a 300 bp (Obr. 15). U pozitivní kontroly (vzorek 3564, fytoplazma stolburu z révy vinné) byl identifikován stejný profil.

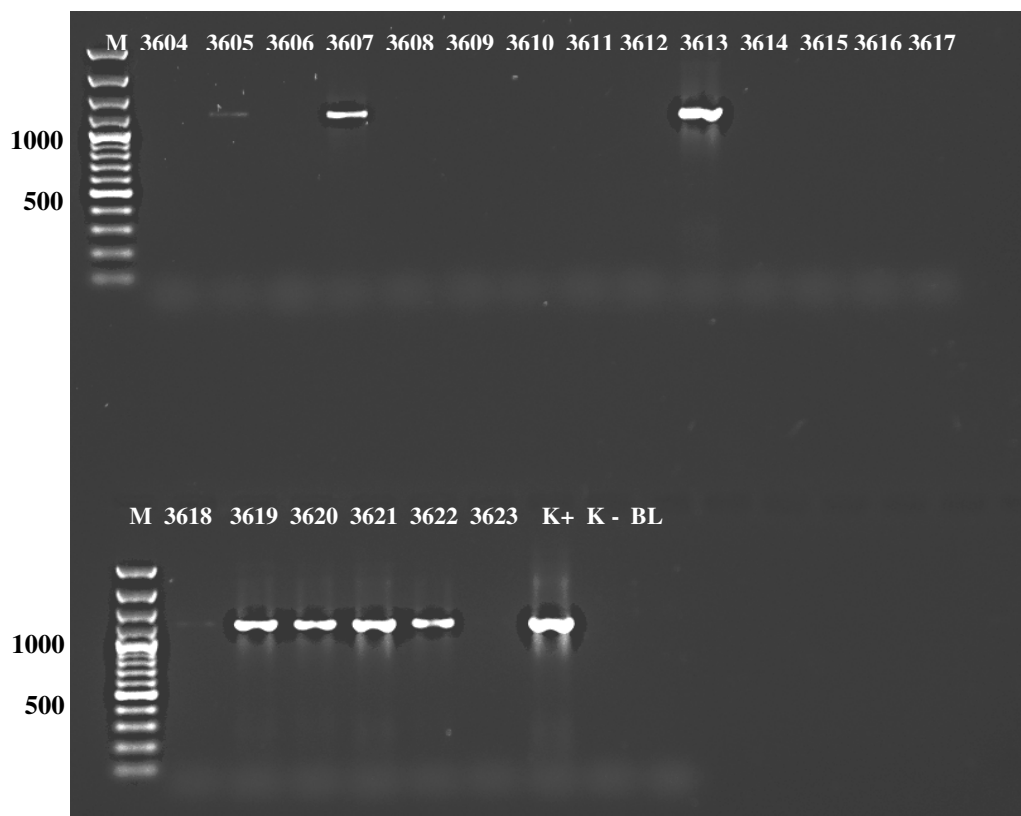
**Tab. 13: Výsledky PCR reakcí a RFLP analýzy u révy vinné**

Pořadové číslo	Číslo izolace DNA	Nested-PCR (F2/R2)	RFLP ( <i>RsaI</i> , <i>MseI</i> )	Nested-PCR ( <i>vmp1</i> gen)	RFLP ( <i>RsaI</i> )	Nested-PCR ( <i>tuf</i> gen)	RFLP ( <i>HpaII</i> )
1	3604	-					
2	3605	+sl	nt	-		-	
3	3606	-					
4	3607	+	STOL	+	Profil II*	+	Tuf -b
5	3608	-					
6	3609	-					
7	3610	-					
8	3611	-					
9	3612	-					
10	3613	+	STOL	-			
11	3614	-					
12	3615	-					
13	3616	-					
14	3617	-					
15	3618	+sl	nt	-		-	
16	3619	+	STOL	-		+	Tuf -b
17	3620	+	STOL	-		+	Tuf -b
18	3621	+	STOL	+	Profil I (V1**)	+	Tuf -b
19	3622	+	STOL	+	Profil I (V1)	+	Tuf -b
20	3623	-					
	K+ (AP, 3770)	+	AP	nt	nt	nt	nt
	K+(STOL, 3564)			+	Profil IV	+	Tuf -b

**Legenda:** (+) – pozitivní reakce, (-) – negativní reakce, +sl – slabý PCR produkt, K+ - pozitivní kontrola reakce, AP – izolát fytoplazmy proliferace jabloně na *Vinca rosea*, nt – nebylo testováno, stol – fytoplazma stolburu

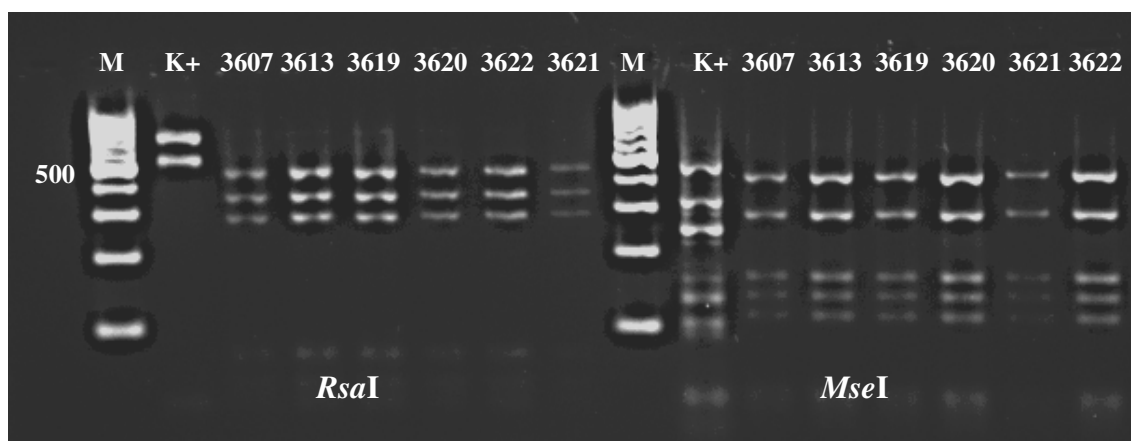
\* profil dle Fialová *et al.* (2009), získaný nested-PCR s použitím primerů TYPH10F/R

\*\* profil dle Pacifico *et al.* (2009), získaný nested-PCR s použitím primerů StolH10F2/R2



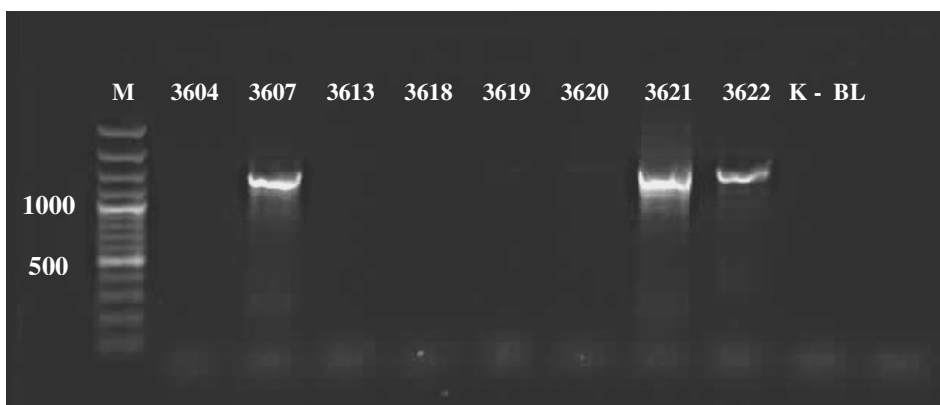
**Obr. 10: Elektroforetogram PCR produktů R16F2/R2**

**Legenda:** M – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), 3604 až 3623 – vzorky DNA révy vinné, K+ – pozitivní kontrola, K– negativní kontrola (zdravá rostlina), BL – slepý vzorek (blank)

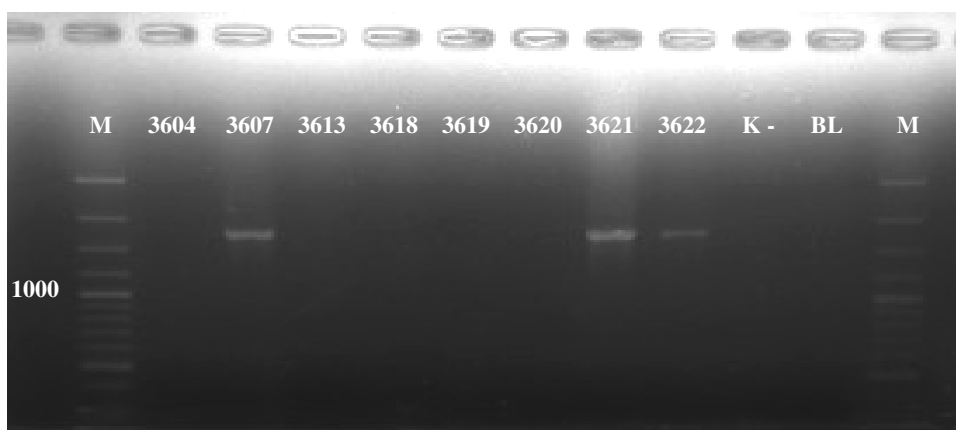


**Obr. 11: Elektroforetogram RFLP analýzy pozitivních PCR produktů F2/R2**

**Legenda:** M – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), 3607 až 3622 – vzorky DNA révy vinné, K+ – pozitivní kontrola reakce

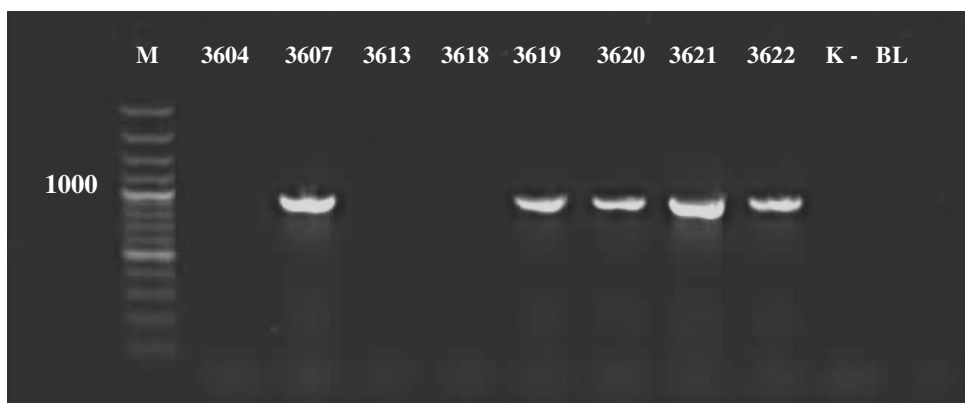


**Obr. 12: Elektroforetogram PCR produktů *vmp1* genu (TYPH10F/R)**



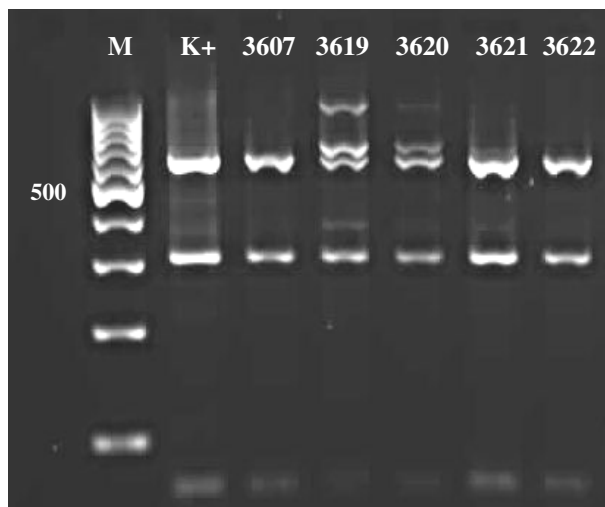
**Obr. 13: Elektroforetogram PCR produktů *vmp1* genu (StolH10F2/R2)**

**Legenda k Obr. 12 a 13:** M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), 3604 až 3622 – vzorky DNA révy vinné, K- – negativní kontrola reakce, BL – blank



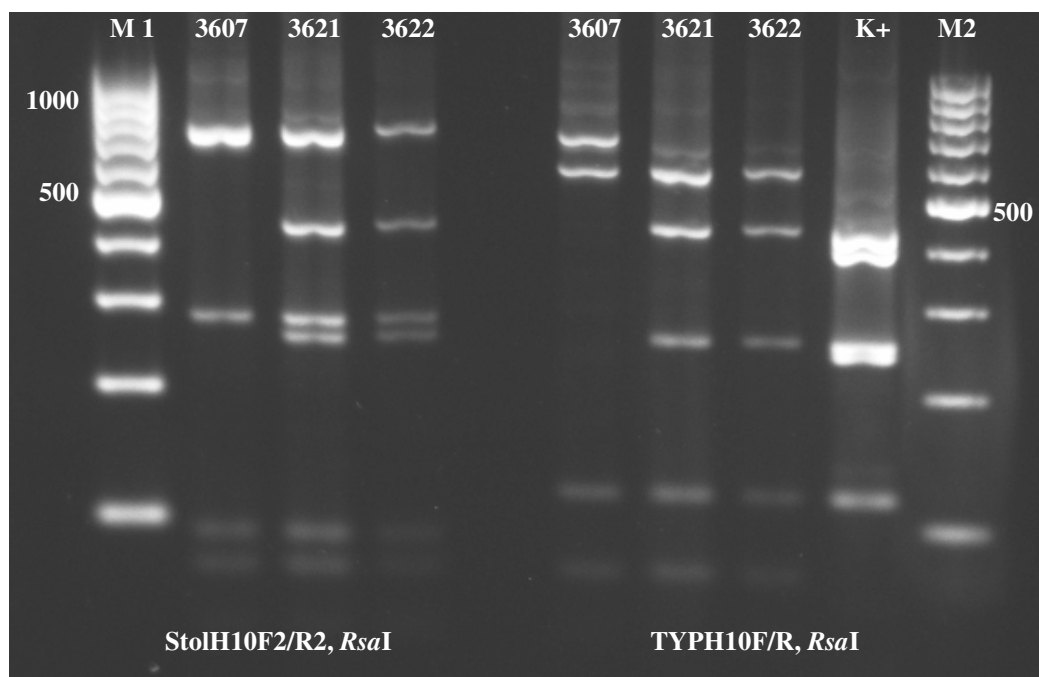
**Obr. 14: Elektroforetogram PCR produktů genu *tuf***

**Legenda:** M – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), 3604 až 3622 – vzorky DNA révy vinné, K- – negativní kontrola reakce, BL – blank



**Obr. 15: Elektroforetogram RFLP analýzy PCR produktů genu *tuf* (*Hpa*II)**

**Legenda:** M - GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), 3607 až 3622 – vzorky DNA révy vinné, K+ – pozitivní kontrola reakce



**Obr. 16: Elektroforetogram RFLP analýzy PCR produktů *vmp1* genu (*Rsa*I)**

**Legenda:** M1, M2 – GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Fermentas), 3607S až 3622S – vzorky DNA révy vinné (primery Stol10F2/R2), 3607T až 3622T – vzorky révy vinné (primery TYPH10F/R), K+ – pozitivní kontrola reakce (primery TYPH10F/R profil IV dle Fialová *et al.*, 2009)



## 6 Diskuze

DNA z rostlin révy vinné (červené odrůdy – Modrý Portugal a Zweigeltrebe), které jevíly příznaky typické pro fytoplazmu stolburu (červenání a svinutka listů, ztráta lignifikace výhonů a scvrkávání bobulí), byla izolována především z žilnatiny, ze stopek listů a případně i ze stonků rostlin. Jak uvádí Navrátil *et al.* (2005), v těchto orgánech se u napadených rostlin fytoplazmy běžně vyskytují.

Jednou z podmínek získání PCR produktu je dostatečně čistá DNA. Za čistou DNA (bez kontaminace) se považuje ta, jejíž poměr hodnot absorbance ( $A_{260}/A_{280}$ ) měřené na spektrofotometru či nanodropu, je v rozmezí od 1,7 do 2,0, tak jak uvádí Navrátil *et al.* (2009b). Po prvním měření byly naše hodnoty nízko pod hranici 1,7, což poukazuje na možnost znečištění proteiny nebo organickými látkami. Při měření koncentrace po přečištění fenol:chloroformovou metodou se hodnoty výrazně zvedly, v mnoha případech však nad hranici 2,0.

Kvůli správnému průběhu PCR reakce a pro možný výskyt inhibičních látek v extrahované DNA je doporučováno ředění DNA izolované z keřů révy vinné rostoucích na poli (Boudon-Padieu *et al.*, 2003b). V našem případě byla do PCR reakce brána DNA ředěná na koncentraci cca 50 ng/μl. I přesto bylo pomocí nested-PCR z celkem dvaceti odebraných příznakových rostlin révy vinné prokázáno pouze osm pozitivních výsledků na přítomnost fytoplazmy. RFLP analýzou šesti z osmi PCR produktů F2/R2 pomocí *RsaI* a *MseI* byla u všech šesti PCR produktů potvrzena fytoplazma stolburu ze skupiny 16SrXII-A dle klasifikace uváděné v Lee *et al.* (1998), Wei *et al.* (2007) a Quaglino *et al.* (2009).

Pozitivní detekce fytoplazmy stolburu tak potvrdila dřívější průzkumy prováděné na vinicích v České republice Červenou *et* Nečekalovou (2007), Červenou *et* Mikulkovou (2008) a Fialovou *et al.* (2009), které výskyt fytoplazmy stolburu (16SrXII-A) na révě vinné rovněž zjistily. Červená *et* Mikulková (2008) analýzou příznakových rostlin na osmnácti lokalitách detekovaly fytoplazmu stolburu ve 33 případech ze 47 příznakových rostlin, což činí asi 70% záchyt. Naše detekce fytoplazmy stolburu v příznakových keřích révy vinné byl však oproti tomu mnohem menší – pozitivní reakci poskytlo jen 40 % analyzovaných příznakových rostlin.

Příčinou nízkého zachytu fytoplazmy stolburu může být, kromě horší kvality vyizolované DNA, i pozdní odběr vzorků rostlin. Odběr byl proveden v druhé polovině září, tedy ke konci vegetačního období vinné révy, kdy v rostlinách může docházet k syntéze látek, které mohou způsobovat inhibici PCR-amplifikace fytoplazmové DNA. Podobné zkušenosti s nespolehlivou detekcí fytoplazmy stolburu z příznakových rostlin révy vinné odebraných od poloviny září mají i pracovníci Státní rostlinolékařské správy (SRS) (Gabriela Schlesingerová, ústní podání). Na velkou koncentraci polyfenolických látek nebo polysacharidů, které mohou zainhibovat PCR reakci upozorňují ve své práci i Ge *et* Maixner (2003).

Pro nested-PCR byla vybrána kombinace univerzálních primerů R16F1/R0 a R16F2/R2, která je uvedena jako jedna z doporučených kombinací pro detekci fytoplazem (Lee *et al.*, 1995). K následné genetické typizaci fytoplazmy stolburu pomocí neribozomálních genů *tuf* a *vmp1* byly brány jen ty vzorky rostlin, u kterých byl prokázán výskyt fytoplazmy stolburu.

Analýza *tuf* genu izolátů fytoplazmy stolburu získaného pomocí nested-PCR s primery fTuf1/rTuf1 a fTufAy/rTufAy a následnou RFLP s *HpaII* pěti rostlin révy vinné neprokázala genetickou variabilitu v tomto genu. Všech 5 vzorků poskytlo stejné restriční profily, které odpovídají typu Tuf-b (Langer *et* Maixner, 2004; Fialová *et al.*, 2009). Langer *et* Maixner (2004) ve své práci zjistili výskyt dvou restričních typů, a to Tuf-a a Tuf-b, které se liší svou specifitou k rezervoárové rostlině. Typ Tuf-a je uváděn ve spojitosti s kopřivou, zatímco Tuf-b souvisí s druhou rezervoárovou rostlinou-svlačcem. Souvislost mezi jednotlivými *tuf* typy a konkrétní rezervoárovou rostlinou potvrdili i ve své práci Maixner *et al.* (2009), kde typ Tuf-b byl nalezen pouze u kopřivy, zatímco typ Tuf-b byl zjištěn jen u izolátů ze svlačce.

Typ Tuf-b je všeobecně více rozšířený, což dokazují i práce Riolo *et al.* (2007), Pasquini *et al.* (2007), Filippin *et al.* (2009), Radonjic *et al.* (2009) nebo Quaglino *et al.* (2009). Fialová *et al.* (2009), která se jako první ve své práci zabývala genetickou variabilitou fytoplazmy stolburu na jižní Moravě v České republice, zjistila rovněž výskyt pouze restričního profilu Tuf-b, a to a to jak na révě vinné, tak i na jiných stolburových rostlinách, především na bramboru, paprice, rajčeti, celeru, durmanu a rovněž ve svlačci, ale také - na rozdíl od ostatních autorů - i v kopřivě. Souvislost mezi jednotlivými izoláty a rezervoárovou rostlinou tak v tomto případě nebyla zjištěna.

V rámci České republiky byl Tuf-b potvrzen i na stolburovém jeteli (*Trifolium pratense*) nalezeném na severní Moravě (Fránová *et al.*, 2009).

Amplifikací *vmp1* genu nested-PCR s primery StolH10F/StolH10R a TYPH10F/TYPH10R a RFLP analýzou pomocí enzymu *RsaI* byly získány pozitivní výsledky pouze u 3 příznakových keřů révy vinné, avšak se dvěma rozdílnými restrikcními profily. U dvou vzorků byl zjištěn profil odpovídající profilu I (zjištěném Fialovou *et al.*, 2009), u třetího vzorku byl zjištěn profil II uváděný v téže práci. Fialová *et al.* (2009) analýzou *vmp1* genu s použitím stejných primerů na souboru rostlin různých rodů však zjistila přítomnost celkem pěti restrikcčních profilů, přičemž v révě vinné byl zjištěn pouze jediný, zcela odlišný profil než v našem případě, a to profil IV.

Pacifico *et al.* (2009) oproti tomu uvádějí 12 restrikcčních profilů *vmp1* genu, což poukazuje ještě na mnohem větší variabilitu tohoto genu. Analýza byla prováděna na révě vinné, svlačci i kopřivě, přičemž zastoupení jednotlivých profilů se lišilo jak v závislosti na hostitelské rostlině, tak i na geografické poloze. Abychom mohli porovnat naše profily *vmp1* genu i s profily, které uvádějí ve své práci Pacifico *et al.* (2009), provedli jsme nested-PCR i s primery StolH10F2/R2, používané v této studii, které detekují úsek *vmp1* genu o cca 300 bp delší než je tomu u primerů TYPH10F/R. Srovnáním získaných profilů jsme zjistili, že profil I dle Fialová *et al.* (2009) odpovídá profilu V1, jež uvádí Pacifico *et al.* (2009). Oproti tomu profil II ze vzorku naší révy vinné neodpovídá žádnému ze dvanácti uvedených profilů. Fialová *et al.* (2009) profil II našla v opletníku, paprice, celeru, pcháči i rajčeti, avšak pro révu vinnou je tento profil zcela novým.

Z prostorového uspořádání analyzovaných keřů révy vinné (viz. Tab. 6) vyplývá, že profily I a II se vyskytují u rostli révy rostoucí na vinici v těsné blízkosti, zatímco další profil II byl nalezen na opačné straně vinice. Tato skutečnost dokazuje, že k šíření onemocnění BN dochází z rostliny na rostlinu, přičemž každá rostlina může být infikována rozdílným typem fytoplazmy stolburu.

Naše výsledky rovněž potvrdily větší variabilitu *vmp1* genu oproti genu *tuf*, kdy jednomu typu Tuf-b odpovídají dva restrikcční profily *vmp1* genu. Rozdílnou variabilitu těchto dvou genů rovněž zjistili i Cimerman *et al.* (2009), Pacifico *et al.* (2009) a Fialová *et al.* (2009).

Výsledky, které jsme získali analýzou genu *tuf* a *vmp1* genu sice odhalily variabilitu mezi izoláty fytoplazmy stolburu, avšak ke zjištění a možnému porovnání více profilů je třeba použít větší množství vzorků. Přítomnost tří různých restričních profilů *vmp 1* genu z izolátů fytoplazmy stolburu na révě vinné v oblasti jižní Moravy však dokazuje, že genetická variabilita fytoplazmy stolburu mezi izoláty se vyskytuje i na našem území.

I přes nízký záchyt fytoplazmy stolburu na příznakových keřích révy vinné se podařilo objevit nový, dosud neuváděný profil *vmp1* genu na révě vinné.

## 7 Závěr

V druhé polovině měsíce září v roce 2009 byla provedena analýza dvaceti příznakových rostlin révy vinné (*Vitis vinifera* L.) z vinice v lokalitě katastru obce Dolní Kounice na jižní Moravě (Česká republika). Pro detekci a identifikaci fytoplazmy stolburu byla provedena nested-PCR s universálními primery R16F1/R0 a R16F2/R2 a RFLP analýza restričními enzymy *RsaI* a *MseI*. Fytoplazma stolburu (*Candidatus* *Phytoplasma solani*, 16SrXII-A) byla potvrzena u osmi rostlin s příznaky onemocnění Bois noir jako je červenání a svinování listů a scvrkávání bobulí.

Genetickou typizací *vmp1* genu (primery StolH10F1/R1, StolH10F2/R2 a TYPH10F/R a následná RFLP analýza s použitím enzymu *RsaI*) byly zjištěny dva odlišné restriční profily u tří rostlin, přičemž jeden z profilů nebyl na révě vinné dosud zjištěn.

Analýzou *tuf* genu s primery Tuf1f/r a TufAyf/r a restričního enzymu *HpaII* byl u pěti rostlin příznakových keřů získán homogenní restriční profil, a to Tuf-b.

## 8 Seznam použitých zkratek

<b>AP</b>	apple proliferation phytoplasma (fytoplazma proliferace jabloně)
<b>BN</b>	Bois noir
<b>bp</b>	base pairs (páry bází)
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
<b>dNTP</b>	deoxynucleosid triphosphate (deoxynukleozidtrifosfát)
<b>ELISA</b>	enzyme linked Immunosorbent Assay (imunoenzymatická metoda)
<b>FD</b>	Flavescence dorée
<b>IRPCM</b>	International Research Programme on Comparative Mycopathology
<b>kb</b>	kilobase (kilobáze)
<b>LN</b>	Legno nero
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
<b>PGY</b>	Palatinate grapevine yellows
<b>PMUs</b>	potential mobile units (potenciální mobilní jednotky)
<b>RFLP</b>	restriction fragment length polymorphism (déлковý polymorfismus restrikčních fragmentů)
<b>STOL</b>	stolbur phytoplasma (fytoplazma stolburu)
<b>TAE</b>	Tris acetate EDTA buffer (Tris-acetátový EDTA pufr)
<b>TBE</b>	Tris borate EDTA buffer (Tris-borátový-EDTA pufr)
<b>VK</b>	Vergilbungskrankheit
<b>16S rRNA</b>	ribosomální RNA se sedimentačním koeficientem 16S
<b>16S rDNA</b>	ribosomální DNA se sedimentačním koeficientem 16S

## 9 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.
- Angelini, E., Bianchi, G.L., Filippin, L., Morassutti, C., Borgo, M. (2007): A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological method* 68: 613-622.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., Foissac, X. (2007): Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasmas strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4001-4010.
- 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.
- Batlle, A., Altabela, N., Sabaté, J., Laviña, A. (2007): Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species, by *Macrosteles quadripunctulatus*. *Annals of Applied Biology* 152: 235-242.
- Bertaccini, A. (2007): Phytoplasma: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Blatný, C., Brčák, J., Limberk, J., Bojňanský, V. (1956): Příspěvek k epidemiologii stolburu v ČSR se zvláštním zřetelem na brambory. *Československá Biologie* 5: 95-104.
- Boudon-Padieu, E. (2003a): The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, pp. 47-53.
- Boudon-Padieu, E., Bejat, A., Clair, D., Larrue, J., Borgo, M., Bertotto, L., Angelini, E. (2003b): Grapevine yellows: Comparison of different procedures for DNA extraction and amplification with PCR for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis* 42 (3): 141-149.
- Buchtová, I., Ehrlichová, M., Pellet, J. (2000): Situační a výhledová zpráva: Réva vinná, Víno Červen 2002.  
[http://www.zf.jcu.cz/research/interni/info\\_2000/vino200006.pdf](http://www.zf.jcu.cz/research/interni/info_2000/vino200006.pdf)
- Bressan, A., Turata, R., Maixner, M., Spiazzi, S., Boudon-Padieu, E., Girolami, V. (2006): Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* 150: 331-339.
- Březíková, M., Linhartová, Š. (2007): First report of Potato stolbur phytoplasma in hemiptera in southern Moravia. *Plant Protect Science*. 43: 73-76.
- Caudwell, A. (1957): Deux années d'études sur la Flavescence dorée, nouvelle malárie grave de la vigne. *Annales d'Amélioration des Plantes* 4: 359-393.
- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., Boudon-Padieu, E. (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42: 151-157.
- 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.

- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10: 526-535.
- Daire, X., Clair, D., Reinert, W., Boudon-Padieu, E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant pathology* 103: 507-514.
- Červená, G., Mikulková, H. (2008): Diagnostika fytoplazem a výsledky průzkumu státní rostlinolékařské správy. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 62-65.
- Červená, G., Nečekalová, J. (2007): *fytoplazmy na révě vinné*. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou.  
[http://www.srs.cz/portaldoc/o\\_nas/publikace\\_srs/Fytoplazmy%20na%20reve.pdf](http://www.srs.cz/portaldoc/o_nas/publikace_srs/Fytoplazmy%20na%20reve.pdf).
- 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.
- Data Sheets on Quarantine Pests. Prepared by CABI and EPPO for the EU.  
<http://www.eppo.org>.
- Davis, R.E., Lee, I.-M. (1993): Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S r DNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 1008-1011.
- Davis, R.E., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R., Lee, I.-M., Osler, R., Carraro, L., Barba, M. (1992): Cloned DNA probes for specific detection of Italian periwinkle virescence mycoplasma-like organisms (MLOs) and investigation of genetic relatedness with other MLOs. *Phytopathologia Mediterranea* 31: 5-12.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, H., 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 pawlownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S., Bertaccini, A. (2003): First report of an elm yellows subgroup 16SrV-C phytoplasma infecting grapevine in Serbia. *Plant Disease* 87: 599-599.
- Edward, M.C., Gibbs, R.A. (1994): Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* 3: 65-75.
- Elnifro, E.M., Ashi, A.M., Cooper, R.J., Klapper, P.E. (2008): Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 559-570.
- Fialová, R. (2008): Interakce fytoplazem s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 26-30.
- 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.
- Filippin, L., Tonon, E., Forte, V., Zottini, M., Santovito, G., Borgo, M., Angelini, E. (2009): Genetic polymorphism of stolbur phytoplasma in grapevine, wild plants and insects. *Progrès Agricole et Viticole*, 2009, Hors Série – *Extended abstracts 16th Meeting of ICVG*, Dijon, France, 31 Aug – 4 Sept, pp. 139-140.
- Firrao, G., Gibb, K., Streten, C. (2005): Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus* phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology* 87: 249-263.
- Fránová, J. (2008): Metody detekce fytoplazmových onemocnění. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 34-41.



- Fránová, J., Navrátil, M., Jakešová, H. (2009): Molecular identification of stolbur phytoplasma associated with red dwarf disease symptoms. *Journal of Phytopathology* 157: 502-506.
- Galetto, 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.
- Ge, Q., Maixner, M. (2003): An internal positive control in PCR-tests for detection of phytoplasma in plants and insects. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, pp. 77.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rhner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176: 5244-5254.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Dickinson, M. (2009): Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2945-2950.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., Namba, S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, B., Gruden, K., Ravnikar, M. (2007): Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology* 56: 785-796.
- IRPCM (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.
- Jermi, M., Schaub, L., Linder, Ch., Gugerli, P., Schärer, S., Colombi, L., Bellion, S., Emery, S. (2007): Distribution of flavescence dorée and *Scaphoideus titanus* in Switzerland. <http://www.acw.admin.ch>
- Kison H., Seemüller E. (2001): Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149: 533-541.
- Kollar, A., Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *Journal of Phytopathology* 141: 395-401.
- Kölber, M., Ember, I., Varga, K., Botti, S., Martini, M., Lázár, J., Bertaccini, A. (2003): Six-year survey of grapevine yellows distribution in Hungary. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, pp. 99-100.
- 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., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D.E. (1995): Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.
- 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., Gundersen-Rindal, D.E., Bertaccini, A. (1998a): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.

- Lee, I.-M., Gundersen, D.E., Hammond, R.W., Davis, R.E. (1994): Use of mycoplasma-like organisms 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., 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.
- Lessio, F., Tedeschi, R., Alma, A. (2007): Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in north-western Italy. *Journal of Plant Pathology* 89: 97-102.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E. (1995): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasma by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Maixner, M., Ahrens, U., Seemüller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* 101: 241-250.
- Maixner, M., Johannesen, J., Seitz, A. (2009): Aspects of the interaction of stolbur phytoplasma, vectors and host plants in the two epidemic systems of bois noir. *Progress Agricole et Viticole, 2009, Hors Série – Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 31 Aug – 4 Sept*, pp. 141-142.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- Martini, M., Murari, E., Mori, N., Bertaccini, A. (1999): Identification and epidemic distribution of two Flavescence dorée-related phytoplasma in Veneto (Italy). *Plant Disease* 83: 925-930.
- Marzachi, C. (2006): Molecular diagnosis of Phytoplasmas. *Arab Journal of Plant Protection* 24: 139-142.
- Milkus, B., Clair, D., Idir, S., Habili, N., Boudon-Padieu, E. (2005): First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *Plant Pathology* 54: 236-236.
- Mitrev, S., Nakova, E., Pejčinovski, F., Angelini, E. (2007): Geographical distribution of “bois noir” phytoplasmas infecting grapevines in the Republic of Macedonia. *Bulletin of Insectology* 60: 155-156.
- Murray, R.G.E., Schleifer, K.H. (1994): Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 174-176.
- Navrátil, M., Válová, P. (2002): Fytoplazma stolburu bramboru [Potato stolbur phytoplasma]. *Rostlinolékař 1*, příloha.
- Navrátil M., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Duchoslav M., Petřík K. (2005): Detectability of European stone fruit yellows phytoplasma using PCR with ribosomal primers. *Phytopathologica Polonica* 35: 117-120.
- Navrátil, M., Válová, P., Šafářová, D., Nečas, T., Krška, B., Polák, J., Kumar, J., Suchá, J., Ludvíková, J. (2009b): Metodika detekce a identifikace karanténních fytoplazm ovocných dřevin. [http://www.lmbm.upol.cz/doc/fyto\\_FLOovocnychdrevin.pdf](http://www.lmbm.upol.cz/doc/fyto_FLOovocnychdrevin.pdf)
- Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Lauterer, P., Šafářová, D., Starý, M. (2009a): 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* 99: 711-715.
- Pacifico, D., Foissac, X., Veratti, F., Marzachi, C. (2007): Genetic diversity of Italian and French „bois noir“ phytoplasma isolates. *Bulletin of Insectology* 60: 345-346.

- Padovan, A.C., Gibb, K.S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfigliolo, R.E., Magarey, P.A., Sears, B.B. (1995): Molecular detection of australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 117-120.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Orosz, A., Bertaccini, A., Kölber, M. (2004): Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis*, 43, 201–203.
- Pasquini, G., Ferretti, L., Gentili, A., Bagnoli, B., Cavalieri, V., Barba, M. (2007): Molecular characterization of stolbur isolates collected in grapevines, weeds and insects in central and southern Italy. *Bulletin of Insectology* 60: 355-356.
- Příbylová, J., Petrzik, K., Špak, J. (2009): The first detection of ‘*Candidatus* Phytoplasma trifolii’ in *Rhododendron hybridum*. *European Journal of Plant Pathology* 124: 181-185.
- Radonjić, S., Hrnčić, S., Jović, J., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Toševski, I. (2009): Occurrence and distribution of grapevine yellows caused by Stolbur phytoplasma in Montenegro. *Journal of Phytopathology* 157: 682-685.
- Riolo, P., Landi, L., Nardi, S., Isidoro, N. (2007): Relationships among *Hyalesthes obsoletus*, its herbaceous host plants and „Bois noir“ phytoplasma strains in vineyard ecosystems in the Marche region (central-eastern Italy). *Bulletin of Insectology* 60: 353-354.
- Růžička, T. (2008): Fytoplazmy jako karanténní patogeny. In: Navrátil, M., Fialová, R. (eds.): Fytoplazmy – významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci, 2008, pp. 44-61.
- 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 mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, S., Tully, J.G. (eds): *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, New York, Academic Press, pp. 369-380.
- 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.
- 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.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C. (1996): Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 8: 2988-2993.
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Myslabodski, D., Mizrahi, Y. (1999): Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus*. *Plant Molecular Biology Reports* 17: 249-254.
- Terlizzi, F., Rattii, C., Pollini, C.P., Pisi, A., Credi, R. (2009): Detection of grapevine Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas by multiplex real-time PCR (TaqMan). *Progrès Agricole et Viticole*, 2009, Hors Série – *Extended abstracts 16th Meeting of ICVG*, Dijon, France, 31 Aug – 4 Sept, pp. 161.
- Trivellone, V., Pinzauti, F., Bagnoli, B. (2005): *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* 88: 103–108.
- 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.
- 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.

## **10 Přílohy**

## **Příloha 1**

### **Vybavení laboratoře:**

1. Termocyklér T-Personal, Biometra
2. Laminární box PV-100, TELSTAR
3. Horizontální elektroforéza Biometra + zdroj stejnosměrného proudu Power Pack P 25, Biometra
4. UV transluminátor G Box + dokumentační systém Syngene, Herolab
5. Mikrovlnná trouba
6. Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd
7. Mini-centrifuga, National Labnet Co. Ltd
8. Termoblok DRI-BLOCK DB-20, Techne
9. Nanodrop 1000, Thermo scientific
10. Chlazená odstředivka K 23D, MLW
11. Vodní lázeň SUB, Grant
12. Výrobník ledové tříště F100 Compact, Icematic

### **Chemikálie a použité roztoky:**

1. Agarose SERVA for DNA electrophoresis, Cat. no. 11404, SERVA
2. Methaphoragarose Cat. no. 50180, Lonza
3. Gel Red<sup>TM</sup> (Nucleic Acid Gel Stain, Biotium)
4. Taq DNA Polymerase, Cat. no. M1665, Promega
5. dTTP, dGTP, dATP, dCTP, Cat. no. U1231, U1211, U1201, U1221, Promega
6. Syntetizované primery: R16R1, R16F0, R16R2, R16F2, StolH10F1, StolH10R1, StolH10F2, StolH10R2, fTuf1, rTuf1, TYPH10F, TYPH10R, fTufAy, rTufAy, Generi-Biotech
7. Vzorkovací roztok (0,1% Bromphenol Blue v 30 % glycerín/ H<sub>2</sub>O, Cat. no. G190A) Promega
8. Standard molekulové váhy: GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder, ready-to-use; GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use, Fermentas
9. TAE pufr (1x pracovní roztok: 40 mM Tris–acetát, 2 mM EDTA;  
50x zásobní roztok: 242 g Tris base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA, 2H<sub>2</sub>O, pH 8,5 doplnit H<sub>2</sub>O do 1000 ml)

10. Restrikční endonukleázy: *Rsa* I, Cat. no. R637A, Promega; *Mse* I, Cat. no. R05255S, BioLabs; *Hpa*II, Cat. no. ER0511, Fermentas
11. Minerální olej (Minerail oil, Cat. no. M5904), SIGMA
12. TBE pufr (1x pracovní roztok: 89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA; 10x zásobní roztok: 108 g Tris base, 55 g boric acid, 40 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0; doplnit H<sub>2</sub>O do 1000 ml)
13. 96% etanol (denaturovaný 2% benzínem), 70% etanol
14. 2-merkptoetanol (78,3 M), SERVA
15. Třecí pufr Delaporta (1x pracovní roztok: 125 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM kyselina askorbová, 10 % sacharóza, 0,15 % BSA, 2 % PVP 10 (MW cca 10 000); pH 7,6)

*Třecí pufr připravíme bezprostředně před použitím přidáním 50 ml demineralizované vody a 0,53 g kyseliny askorbové k 50 ml zásobního roztoku třecího pufru (2x), pH upravíme na 7,6 pomocí 3M NaOH.*

16. DNA-extrakční pufr

(2,5%)	CTAB	12,5 g
(1,4 M)	NaCl	40,9 g
(20 mM)	Na <sub>2</sub> EDTA	3,72 g
(100 mM)	Tris-HCl	6,06 g Tris
(1%)	PVP 44000	5 g

*Těsně před použitím přidat 0,2 % 2-merkptoetanolu – tj. na 20 ml DNA-extrakčního pufru přidat 40 µl 2-merkptoetanolu.*

17. Chloroform/isoamylalkohol (24:1) - 240 ml chloroform, 10 ml isoamylalkohol

18. TE-pufr

(10 mM)	TRIS	0,606 g
(1 mM)	Na <sub>2</sub> EDTA	0,186 g

*Přidat demineralizovanou vodu (vodivost cca 0,1 µS/cm, atoklávovaná) do celkového objemu roztoku 500 ml a pH upravit na 8,0 pomocí konc. HCl.*

## Příloha 2:

Podmínky PCR reakce s použitím primerů R16F1/R0 a R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1993):

<b>Predenaturace</b>	94 °C, 2 min		
1. Denaturace	95 °C, 1 min	}	35 cyklů
2. Annealing	50 °C, 2 min		
3. Extension	72 °C, 3 min		
<b>Elongace</b>	72 °C, 10 min		

## Příloha 3:

Podmínky direkt-PCR *vmp1* genu s primery StolH10F1/R1 a StolH10F2/R2 (Pacifico *et al.*, 2009):

<b>Predenaturace</b>	94 °C, 4 min		
1. Denaturace	94 °C, 30 s	}	35 cyklů
2. Annealing	52 °C, 30 s		
3. Extension	72 °C, 2 min		
<b>Elongace</b>	72 °C, 10 min		

Podmínky direkt-PCR genu *tuf* s primery fTuf1/rTuf1 (Schneider *et al.*, 1997):

<b>Predenaturace</b>	95 °C, 1 min 30 s		
1. Denaturace	95 °C, 30 s	}	35 cyklů
2. Annealing	45 °C, 30 s		
3. Extension	72 °C, 1 min		
<b>Elongace</b>	72 °C, 10 min		

#### **Příloha 4:**

Podmínky nested-PCR *vmp1* genu s primery **TYPH10F/TYPH10R** (Fialová *et al.*, 2009):

<b>Pre-denaturace</b>	94 °C, 4 min		
1. Denaturace	94 °C, 30 s	}	35 cyklů
2. Annealing	55 °C, 30 s		
3. Extension	72 °C, 90 s		
<b>Elongace</b>	72 °C, 10 min		

Podmínky nested-PCR genu *tuf* s primery **fTufAy/rTufAy** (Schneider *et al.*, 1997):

<b>Pre-denaturace</b>	95°C, 1 min 30 s		
1. Denaturace	95 °C, 30 s	}	35 cyklů
2. Annealing	55 °C, 30 s		
3. Extension	72 °C, 1 min		
<b>Elongace</b>	72 °C, 10 min		