

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

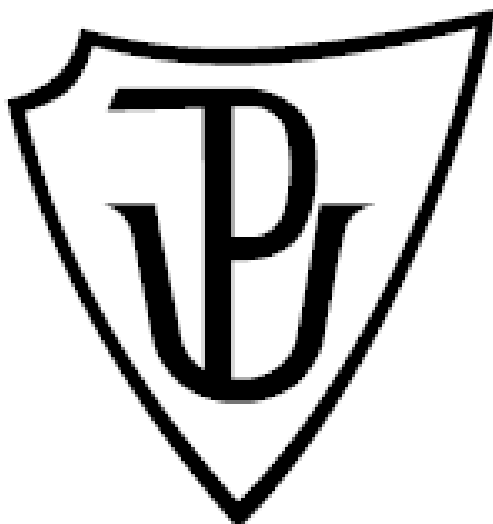
Olomouc 2014

Hana Crlíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární identifikace fytoplazmy
stolburu v hmyzím vektoru:
*Anaceratagallia ribauti***

Bakalářská práce

Hana Crlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Molekulární identifikace fytoplazmy stolburu v hmyzím vektoru: *Anaceratagallia ribauti*“ zpracovala samostatně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne 9. 5. 2014

Hana Crlíková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla a také bych ráda poděkovala Janě Veselské a Mgr. Martinu Starému za jejich pomoc při práci v laboratoři. Mé díky patří i rodičům a sestře, kteří mi byli oporou. Děkuji Interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA PrF_2013_002) za podporu.

Shrnutí

Fytoplazmy jsou nehelikální prokaryotické organizmy, které postrádají buněčnou stěnu. Jsou to intracelulární parazité rostlin, vyskytující se v lýku a patří mezi ekonomicky významné patogeny, kteří způsobují stovky nemocí rostlin. Pomocí analýzy 16S rRNA genu byly jednotlivé fytoplazmy rozříděny do několika skupin. Fytoplazmy je možné detekovat pomocí přímé nebo nested PCR na 16-3S rDNA, ale také pomocí imunoenzymatické metody DAS-ELISA.

Cílem této práce bylo určit fytoplazmy, u kterých je hmyzí vektor *Anaceratagallia ribauti* hostitelem, který byl odchycen na třech lokalitách jižní Moravy: Perná, Březí a Lednice v letech 2010, 2011 a 2012.

Pro molekulární detekci a identifikaci fytoplazem byly použity primery P1/P7 a R16F2/R16R2, restriční endonukleázy *MseI* a *RsaI*. Bylo zjištěno, že hmyzí vektor *Anaceratagallia ribauti* je hostitelem *Candidatus* *Phytoplasma asteris* a *Candidatus* *Phytoplasma solani*.

Summary

Phytoplasmas are non-helical cell-wall-less prokaryotic organisms. They are internal pathogens of plants that occur in phloem and belong to significant economical pathogens that cause hundreds of plant diseases. Due to analysis of 16S rRNA gene each phytoplasmas were sorted into several groups. Phytoplasmas can be detected by direct or nested PCR on 16-3S rDNA and also thanks to DAS-ELISA.

The aim of the thesis was to determine which phytoplasmas occur in insect vector *Anaceratagallia ribauti* that was captured in three localities from south Moravia Perná, Březí and Lednice in years 2010, 2011 and 2012.

Primers P1/P7 and R16F2/R16R2, restriction endonucleases *MseI* and *RsaI* were used for molecular identification and detection of phytoplasmas. It was found out that insect vector *Anaceratagallia ribauti* is host of *Candidatus* *Phytoplasma asteris* and *Candidatus* *Phytoplasma solani*.

Obsah

1	Cíl práce	8
2	Úvod	9
3	Literární přehled	10
3.1	Obecná charakteristika fytoplazem	10
3.2	Objev fytoplazem	10
3.3	Klasifikace fytoplazem metodami molekulární biologie	11
3.4	<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani – fytoplazma stolburu	12
3.5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris – fytoplazma žloutenky aster	13
3.6	Hmyzí vektory	14
3.6.1	Obecná charakteristika hmyzích vektorů	14
3.6.2	Životní cyklus fytoplazem a interakce s hmyzím vektorem	14
3.6.3	Hmyzí vektory fytoplazmy stolburu	15
3.6.4	Hmyzí vektory fytoplazmy žloutenky aster	17
3.6.5	Hmyzí vektor – <i>Anaceratagallia ribauti</i>	17
3.6.6	Potvrzení, že <i>Anaceratagallia ribauti</i> je vektorem	18
3.6.7	Potenciální vektory	19
4	Experimentální část	22
4.1	Materiál	22
4.2	Izolace DNA	22
4.3	PCR amplifikace a detekce PCR produktů	23
4.3.1	Nested PCR.....	23
4.3.2	Elektroforéza PCR produktu	26
4.4	RFLP analýza	26
4.4.1	RFLP	26
4.4.2	Vyhodnocení RFLP analýzy	27
4.5	Seznam použitých chemikálií	28
4.6	Přístrojové vybavení laboratoře	29
4.7	Seznam použitých pomůcek	30
5	Výsledky	31
6	Diskuze	45
7	Závěr	46
8	Seznam použitých zkratk	47
9	Seznam použité literatury	48

1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma „Molekulární identifikace fytoplazmy stolburu v hmyzím vektoru: *Anaceratagallia ribauti*“.

V experimentální části bakalářské práce byla provedena detekce a identifikace fytoplazem v hmyzím vektoru *Anaceratagallia ribauti* pomocí nested PCR a RFLP analýzy.

2 Úvod

Tato práce se zabývá detekcí a výskytem fytoplazem v hmyzím vektoru *Anaceratagallia ribauti* pomocí dostupných laboratorních metod.

Fytoplazmy jsou prokaryotické organizmy, které postrádají buněčnou stěnu a mají specifické životní nároky. Poprvé byly pozorovány v sítkovicích aster v 60. letech 20. století. Fytoplazmy napadají sítkovce rostlin, ale vyskytují se i v merách (*Psyllidae*), křísech (*Auchenorrhyncha*) a plošticích (*Miridae*), které je přenášejí na rostliny nebo jsou jen hostiteli. Fytoplazmy jsou původcem stovek nemocí rostlin a nejčastějšími projevy těchto infekcí je chloróza a deformace listů, proliferace či zakrslý růst. Studium chorob vyvolaných fytoplazmami je velmi důležité z důvodu jejich výskytu na mnoha ekonomicky významných plodinách (např. bramboru, rajčeti, mrkvi, celeru, cibuli a révě vinné) a snižování kvality i množství úrody.

V této bakalářské práci byla provedena molekulární detekce fytoplazem pomocí nested PCR a následně byla provedena RFLP analýza. V experimentální části byla provedena molekulární detekce fytoplazem pomocí nested PCR a následně byla provedena RFLP analýza.

3 Literární přehled

3.1 Obecná charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou zřejmě příbuzné s grampozitivními bakteriemi, *Clostridium* podobnému zástupci rodu *Lactobacillus*. Fytoplazmy jsou obligátní intracelulární parazité a způsobují stovky nemocí rostlin po celém světě (Wei *et al.*, 2007).

Fytoplazmy jsou kulovité, oválné či protáhlé buňky, které jsou obaleny plazmatickou membránou. Uvnitř cytoplazmy můžeme pozorovat ribozomy a vlákna DNA. Velikost fytoplazem je závislá na jejich tvaru a mohou dosahovat 200 až 800 nm. Fytoplazmy kulovitého tvaru jsou nejmenší a naopak protáhlého tvaru jsou největší. Vzhledem k životním nárokům fytoplazem nemohou být kultivovány *in vitro*. Fytoplazmy jsou přenášeny hmyzími vektory: merami (*Psyllidae*), křísy (*Auchenorrhyncha*) a plošticemi (*Miridae*). Druhá možná cesta přenosu je vegetativně pomocí roubů, oček a hlíz. Třetí možný způsob přenosu je prostřednictvím parazitických rostlin, jakou je například kokotice (*Cuscuta*). Fytoplazmy jsou původcem mnoha významných chorob zemědělských plodin např. stolbur bramboru, stolbur papriky, stolbur rajčete, proliferace jabloně, chřadnutí hrušně nebo evropská žloutenka peckovin (Navrátil *et al.*, 2008).

3.2 Objev fytoplazem

Fytoplazmy byly objeveny v roce 1967. V tomto roce byly vydány publikace o mykoplazmách nebo mykoplazmám podobných organizmech. Tyto organizmy byly poprvé pozorovány v lýku aster (Doi *et al.*, 1967). Shitaka *et al.* (1969) provedli stovky řezů listy v různých stádiích nemoci – když byly na listech světlé proužky nebo když byly celé listy světlé. Bohužel žádné uniformní částice, které mohly být považovány za virus, nebyly nalezeny ani v cévních svazcích, ani v parenchymatických buňkách. Díky elektronové mikroskopii byly objeveny velké mikroorganizmy, které se nacházely v sítkovicích. Tyto mikroorganizmy se vyskytovaly jen v sítkovicích nemocných listů a nikdy v sítkovicích zdravých listů. Velikost i tvar těchto mikroorganismů byly variabilní (Shitaka *et al.*, 1969). Dále bylo zjištěno, že tyto organizmy nemají buněčnou stěnu, ale dvojitou membránu. Uvnitř těchto mikroorganismů byly pozorovány ribozomální granula, centrální vakuola a síti podobný nukleární útvar (Doi *et al.*, 1967).

Přestože byly tyto mikroorganismy nalezeny v listech vykazujících symptomy nemoci, nebylo zcela jisté, zda způsobují nemoc. Proto byl zkoumán efekt antibiotik na infikované rostliny. Bylo zjištěno, že antibiotika mají na rostliny pozitivní efekt. Při testech bylo používáno antibiotikum tetramycin, které se používá při léčbě nemocí způsobených gram pozitivními bakteriemi. Je-li rostlina napadena, antibiotika nemoc potlačí, ale nevyléčí ji. Pokud se antibiotiky ošetří semena, potom je rostlina, která z nich vyroste, zdravá (Shitaka *et al.*, 1969). Nicméně tento závěr byl pravděpodobně nesprávný. Důvodem proč z takto ošetřených semen vyrostou zdravé rostliny, je skutečnost, že fytoplazmy se vyskytují jen v sítkovicích rostlin. Sítkovice rostlin a semena nejsou spolu přímo spojena, a proto přenos fytoplazem touto cestou není možný (Christensen *et al.*, 2005).

3.3 Klasifikace fytoplazem metodami molekulární biologie

Přestože jsou fytoplazmy spojovány s více jak stovkou onemocnění rostlin, nikdo dosud nezveřejnil možnost kultivace *in vitro*. Do osmdesátých let byla klasifikace fytoplazem založena na jejich biologických vlastnostech, jako jsou specifická k rostlinnému a hmyzímu hostiteli a také na symptomech, kterými se vyznačovaly napadené rostliny. Určení těchto vlastností trvalo velmi dlouho a přesto nebylo jednoznačné. V 90. letech 20. století nastal převrat díky molekulárním metodám, které se začaly využívat ke klasifikaci. Začaly se používat próby a monoklonální protilátky. Tyto metody umožnily klasifikovat fytoplazmy na základě DNA-DNA homologie a sérologických dat. Senzitivita těchto metod k určení fytoplazem vyskytujících se v lýku však nebyla dostačující vzhledem k jejich nízké koncentraci. Díky objevu PCR a specifických primerů, které byly navrženy na základě klonovaných DNA fytoplazem, se značně zvýšila citlivost jejich detekce. K fylogenetickým analýzám byl využíván úsek 16S rRNA a geny pro ribozomální protein. Tyto analýzy odhalily, že fytoplazmy tvoří velký monofyletický shluk uvnitř třídy *Mollicutes*.

PCR s využitím univerzálních primerů odvozených od konzervativního úseku 16S rRNA nebo primerů specifických pro fytoplazmy poprvé poskytly citlivou metodu na určování fytoplazem z lýka napadených rostlin. Díky přímé analýze sekvence nebo RFLP analýze amplifikované 16S rRNA pomocí PCR se detekované fytoplazmy odlišily a mohly být přesněji klasifikovány. Klasifikace

na základě RFLP poskytla jednoduchou a rychlou metodu, kterou bylo možno využít k rozlišení a určení velkého počtu fytoplazem v relativně krátkém čase. Nicméně v některých případech docházelo k tomu, že skupiny fytoplazem klasifikovaných na základě RFLP analýzy s použitím malého počtu restričních enzymů se neshodovaly se skupinami vytvořenými na základě fylogenetické analýzy 16S rRNA genové sekvence.

Na základě RFLP analýzy amplifikovaných 16S rRNA pomocí PCR za použití 15 restričních enzymů byla navržena klasifikace fytoplazem do devíti skupin. Jednotlivé skupiny vznikly na základě podobnosti v DNA-DNA homologii a sérologických dat. Podskupiny uvnitř každé skupiny byly vytvořeny na základě rozdílnosti restričních míst identifikovaných na základě RFLP analýzy 16S rRNA. Předběžně bylo vytvořeno 14 podskupin. Klasifikační schéma se posléze rozrostlo o jednu skupinu a šest podskupin. Pro lepší rozlišení podskupin byla navržena kombinace RFLP analýzy 16S rRNA a ribozomální proteinové genové sekvence (Lee *et al.*, 1998).

Dodnes je využívána klasifikace, kterou navrhli Lee *et al.* (1998). Tento široce uznávaný klasifikační systém rozlišuje 18 skupin a 40 podskupin. V posledních letech byl objeven velký počet rozmanitých fytoplazem. Tyto objevy vedly k názoru, že počet 16S rRNA RFLP skupin a podskupin se výrazně zvýší. Avšak pokusy o aktualizaci klasifikace na základě klasické RFLP selhaly. Technický pokrok umožnil aktualizovat systém klasifikace fytoplazem díky DNA sekvencím. Data získaná touto metodou se pomocí bioinformačních přístupů dala využít k simulaci restriční analýzy *in silico*. Na základě těchto dat bylo vytvořeno 10 nových skupin (Wei *et al.*, 2007).

3.4 *Candidatus Phytoplasma solani* – fytoplazma stolburu

Fytoplazmy patřící do skupiny 16SrXII mají mnoho rostlinných hostitelů a jsou přenášeny hmyzími vektory z rodu *Cixidae*. Skupina 16SrXII je tvořena '*Candidatus Phytoplasma australiense*', '*Candidatus Phytoplasma japonicum*' a '*Candidatus Phytoplasma fragariae*'. Skupina fytoplazem 16SrXII je spojována se stolburem bylin a stromů, ale i chorobou Bois noir u révy vinné. Fytoplazmy způsobující tato onemocnění byly zařazeny do '*Candidatus Phytoplasma solani*'. Tento druh byl vytvořen, protože tyto fytoplazmy vykazují méně než 97,5% shody s rDNA výše zmíněných druhů. Tento druh může být od ostatních druhů odlišen

díky sekvencím genů *tuf*, *secY*, *rplV-rpsC*. Celkem bylo identifikováno 52 SNP, jen v genu *rplV-rpsC* bylo identifikováno 31 SNP. '*Candidatus Phytoplasma solani*' je v Evropě spojována s Bois noir révy vinné (Quaglino *et al.*, 2008), stolburem rajčat, stolburem papriky (Navrátil *et al.*, 2009). Bois noir byla detekována v mnoha zemích např. ve Francii, Chorvatsku, Řecku, Izraeli, Itálii, Slovinsku, Španělsku (Battle *et al.*, 2000), Maďarsku (Dér *et al.*, 2007), Bosně a Hercegovině (Delić *et al.*, 2007). Vektory fytoplazem stolburu jsou *Hyalestes obsolentus* Signoret (Carraro *et al.*, 2008), *Pentastrius beieri* Wagner (Gatineau *et al.*, 2000), *Reptalus panzeri* (Cvrković *et al.*, 2014), *Anaceratagallia ribauti* (Riedle-Bauer *et al.*, 2008), potenciálními vektory fytoplazmy stolburu jsou *Reptalus quinquecostatus* a *Dictyophara europa* (Cvrković *et al.*, 2011), viz kapitoly 3. 6. 3 a 3. 6. 6. U fytoplazmy stolburu, která se vyskytovala v České republice, byly analyzovány geny *tuf*, *secY* a *vmp1*. Na základě této analýzy bylo zjištěno, že restriční profil získaný za použití restriční endonukleázy *HpaII* odpovídá profilu *tuf-b* (VK II). Několik izolátů ze skupiny stolburu bylo od sebe odlišeno pomocí analýzy sekvence genu *tuf*. Dosud byly popsány 3 typy původce Bois noir – VK I, VK II a VK III. Všechny tři typy byly nalezeny ve *Vitis vinifera* a *Hyalestes obsolentus*. VK I byl identifikován v *Urtica dioica*, VK II byl nalezen v *Convolvulus arvensis* a VK III byl identifikován v *Calystegia sepium* (Riedle-Bauer *et al.*, 2008).

3.5 *Candidatus Phytoplasma asteris* – fytoplazma žloutenky aster

Fytoplazmy patřící do skupiny žloutenky aster (16Srl) jsou početné a jsou rozšířeny po celém světě. Fytoplazmy patřící do této skupiny vykazující více jak 97% podobnost v jejich 16S rDNA sekvencích. Pomocí RFLP analýzy 16S rDNA a genu *tuf* bylo vytvořeno 10 podskupin. Zástupci patřící do skupin 16Srl-A, 16Srl-B a 16Srl-C jsou rozšířeni po celém světě, jsou spojováni s více jak 80 druhy rostlin a mohou být přenášeni více jak 30 druhy hmyzích vektorů. Podskupina 16Srl-B je nejrozmanitější a nejobsáhlejší. Podskupiny 16Srl-L a 16Srl-M jsou rozšířeny výhradně v Evropě. Ostatní podskupiny 16Srl jsou spojovány s úzkou škálou rostlinných a hmyzích hostitelů, z tohoto důvodu nemoci vyvolané těmito fytoplazmami jsou obvykle omezené jen na určitá geografická území (Lee *et al.*, 2004). Fytoplazmy žloutenky aster infikují celer, salát (Hoy *et al.*, 1999), mrkev (Duduk *et al.*, 2008) a révu vinnou (Palermo *et al.*, 2004). Vektory fytoplazem žloutenky aster jsou *Macrosteles quasdrilineatus* Forbes (Frost *et al.*,

2011), *Macrosteles fasciformis* (Lee *et al.*, 1998), *Mgenia fuscovaria* (Krüger *et al.*, 2011) viz 3. 6. 4. V České republice se vyskytují fytoplazmy žloutenky aster patřící do skupiny 16Srl-B (Bertaccini *et al.*, 1999).

3.6 Hmyzí vektory

3.6.1 Obecná charakteristika hmyzích vektorů

Je velice důležité objasnit vztahy mezi fytopatologickými *Mollicutes* s jejich hmyzími ale i rostlinnými hostiteli. Nemoci způsobené fytoplazmami by mohly být kontrolovány skrze hmyzí vektory nebo eliminací infikovaných rostlin pomocí kultivace rostlin z meristémového vrcholu (Bertaccini *et al.*, 2009). K tomu, aby fytoplazmy infikovaly rostlinu, potřebují hmyzí vektor; mery (*Psyllidae*) nebo křísy (*Auchenorrhyncha*); který saje floémovou tekutinu ze sítkovic. Obvykle platí, že jedna fytoplazma je přenášena jedním hmyzím vektorem (Garnier *et al.*, 2001). Fytoplazmy žloutenky aster mají specifické hmyzí vektory, ale některé hmyzí vektory mohou přenášet jak podskupinu 16Srl-A tak i 16Srl-B. Z tohoto důvodu je velmi komplikované objasnit vztahy mezi hmyzím vektorem, fytoplazmou a rostlinou (Lee *et al.*, 2003).

3.6.2 Životní cyklus fytoplazem a interakce s hmyzím vektorem

Fytoplazmy se mohou množit jednak v hmyzím vektoru, ale i v rostlině. Vztahy mezi hmyzím vektorem a fytoplazmou jsou komplexní. Fytoplazmy jsou intracelulární parazité a jsou přenosné do rostlin tehdy, pokud je jejich akumulace ve slinných žlázách hmyzího vektoru dostatečně vysoká (Webb *et al.*, 1999). Životní cyklus fytoplazem v hmyzím vektoru je následující. Fytoplazmy z rostliny infikují hmyzího jedince během jeho sání floémové tekutiny rostliny (Kawakita *et al.*, 2000). Poté se fytoplazmy dostávají do střeva, hemolymfy a malpigických trubic. Období latence, kdy dochází k množení fytoplazem uvnitř těla hostitele, předchází době, kdy je hmyzí vektor schopný přenášet fytoplazmu. Během latentní fáze fytoplazma penetruje epiteliální buňky střeva a zde se replikuje. Poté fytoplazmy penetrují bazální membránu a vstupují do hemocelu hmyzího jedince. Fytoplazmy se dále replikují v hemolymfě. Hmyzí jedinec se stává infekčním, pokud fytoplazmy penetrují membránu slinných žláz. Ve slinných žlázách se dále množí. Pokud by fytoplazmy nebyly schopné vniknout do slinných žláz, hmyzí jedinec by je pak nebyl schopen přenést na zdravou rostlinu. Fytoplazmy se v něm

musí namnožit tak, aby během krmení hmyzího jedince na rostlině tuto rostlinu infikovaly (Webb *et al.*, 1999). Předpokládá se, že vertikální přenos fytoplazem do další generace hmyzích jedinců není možný, jelikož fytoplazmy neinfikují genitálie. Fytoplazmy žloutenky aster byly zřídka identifikovány v ovariích *Macrosteles fasciformis*, ale ve varlatech se je nepodařilo identifikovat (Kawakita *et al.*, 2000). Nicméně u jedinců druhu *Matsumuratettix hiroglyphicus* byly fytoplazmy detekovány jak ve vajíčkách, tak i v nymfách. Na základě těchto zjištění lze uvažovat o tom, že rezervoárem fytoplazem nejsou jen rostliny, ale i hmyzí jedinci (Hanboonsong *et al.*, 2002).

Vztah mezi patogenem a jeho vektorem může být pro vektor výhodný ale i nevýhodný. Při hodnocení tohoto vztahu se bere v úvahu přežití a plodnost hmyzích vektorů. Předpokládá se, že vztah mezi patogenem a jeho hmyzím vektorem se vyvíjí, patogen se postupně stává méně patogenní pro svůj hmyzí vektor. V některých případech se může stát, že fytoplazma snižuje plodnost a dobu života u svého hmyzího vektoru. Tento jev byl pozorován u fytoplazmy Flavescence Doré a *Scaphoideus titanus* (Bressan *et al.*, 2004). V jiných případech, pokud je hmyzí vektor dobře adaptovaný na fytoplazmy, může z jejich přítomnosti mít prospěch jako je např. prodloužení života a zvyšování plodnosti. Takovým příkladem může být vztah mezi *Macrosteles quadrilineatus* a fytoplazmou žloutenky aster (Beanland *et al.*, 2000). Všeobecně tedy můžeme předpokládat, že fytoplazmy jsou virulentnější k organizmům, které nejsou jejich přirozenými vektory (Elliot *et al.*, 2003).

3.6.3 Hmyzí vektory fytoplazmy stolburu

Fytoplazmy jsou floémem limitovaní patogeni rostlin - kulturně pěstovaných plodin jako jsou zelenina, ovoce a dřeviny, ale i volně rostoucích rostlin. Nemoci, které způsobují fytoplazmy, jsou hodnoceny obvykle jako endemické. Jsou-li vhodné podmínky, počet nakažených rostlin velmi rychle narůstá. Pro fytoplazmy je zásadní přítomnost vhodné hostitelské rostliny, ale i vektoru (Carraro *et al.*, 2008). Řád *Hemiptera* je velký a různorodý, jedinci se vyskytují po celém světě. Jedinci tohoto řádu sdílejí některé charakteristiky – jsou hemimetabolomní, nymfy a dospělci se žíví podobně. Z tohoto důvodu i nymfy mohou přenášet fytoplazmy, jejich stravování je specifické a selektivní, jelikož si vybírají jen určitá rostlinná pletiva (Wilson *et al.*, 2007).

Fytoplazma stolburu se vyskytuje téměř po celém světě a má širokou škálu hostitelských rostlin. V západní Evropě byl identifikován vektor *Hyalestes obsolentus* Signoret, který přenáší fytoplazmu stolburu na révu vinnou, na které způsobuje nemoc zvanou Bois noir (Carraro *et al.*, 2008). Okřídlení dospělci se ve vinicích vyskytují od konce června do konce září. Populace je největší kolem poloviny července. V tomto období je nakaženo fytoplazmou stolburu až 40 % jedinců. *Hyalestes obsolentus* se neživí jen na révě vinné, ale i na ostatních rostlinách jako *Amaranthus retroflexus* L., *Silene alba* Krause, *Chenopodium album* L., *Artemisia vulgaris* L., *Cirsium arvense* L., *Picris echioides* L., *Convolvulus arvensis* L., *Catystegia sepium* L., *Mentha arvensis* L., *Medicago sativa* L., *Malva sylvestris* L., *Plantago lanceolata* L., *Sataria viridis* L., *Potentilla reptans* L., *Salix alba* L., *Datura stramonium* L., *Ulmus campestris* L., *Urtica dioica* L. (Credi *et al.*, 2006). Dalším identifikovaným vektorem je *Pentastrius beieri* Wagner. Ten infikuje fytoplazmou stolburu cukrovou řepu. Takto infikované rostliny produkují mnohem méně cukru, listy žloutnou a kořen má sice normální tvar, ale obsahuje hnědé cévní svazky. *Pentastrius beieri* Wagner se hojně vyskytuje během léta na polích s cukrovou řepou. *Pentastrius beieri* Wagner je velmi významný vektor fytoplazmy stolburu. Populace mají vysoký podíl nakažených jedinců (Gatineau *et al.*, 2000). Dalším identifikovaným vektorem je *Reptalus panzeri*. Tito hmyzí jedinci se vyskytují v jihovýchodní Evropě, střední Evropě, Asii a jsou schopni přenášet fytoplazmu stolburu na kukuřici, révu vinnou a cukrovou řepu. *Reptalus panzeri* hraje důležitou roli u dvou nemocí způsobených fytoplazmou stolburu „maize redness disease“ a Bois noir. *Reptalus panzeri* se vyskytuje především na slunných kopcích a náhorních plošinách, jeho dospělci jsou polyfágní (Cvrković *et al.*, 2014). Předpokládá se, že existuje mnohem více hmyzích vektorů fytoplazmy stolburu. Potenciálními vektory fytoplazmy stolburu jsou *Reptalus quinquecostatus* a *Dictyophara europia*. Bylo potvrzeno, že *Dictyophara europia* může přenášet fytoplazmu stolburu z klematisu na révu vinnou. Jedinci jsou polyfágní, vyskytují se ve vinicích od poloviny května do konce září. Je však zapotřebí dalších studií, aby bylo prokázáno, že jde o vektor fytoplazmy stolburu (Cvrković *et al.*, 2011).

3.6.4 Hmyzí vektory fytoplazmy žloutenky aster

Žloutenka aster je nemoc rostlin, která je způsobena fytoplazmou žloutenky aster. Fytoplasma žloutenky aster má relativně širokou škálu hostitelů – přes 350 druhů rostlin. Nejdůležitějším vektorem fytoplazmy žloutenky aster je *Macrosteles quasdrilineatus* Forbes (Frost *et al.*, 2011). *Macrosteles quasdrilineatus* Forbes je polyfágní a má více jak 300 rostlinných hostitelů. Jedinci jsou schopni se přemísťovat na velké vzdálenosti, avšak mohou se vyskytovat i jen lokálně - závisí to na preferenci k rostlinnému hostiteli. *Macrosteles quasdrilineatus* Forbes se velmi rychle a s vysokou frekvencí rozšiřuje ze salátu v porovnání s čekankou a kukuřicí (Szendrei, 2012). *Macrosteles fasciformis* je vektor fytoplazmy žloutenky aster, který se vyskytuje v Jižní Americe, ale je schopen přenášet evropské i americké kmeny žloutenky aster (Lee *et al.*, 1998). V Manitobě přezimuje ve formě vajíček a nymfy se začínají vyskytovat od poloviny května. V polovině srpna je populace největší, jelikož v této době nejvíce roste salát, na kterém se dospělci živí. *Macrosteles fasciformis* se živí i na ječmenu, žitě, pšenici a travách. Hmyzí jedinci se přemísťují z jednoho druhu rostlin na jiný především na jaře (Westdal *et al.*, 1960). V roce 2006 začala réva vinná na vinicích v jižní Africe vykazovat znaky infekce fytoplazmy žloutenky aster. Nejvíce rozšířeným druhem byla *Mgenia fuscovaria*. Usuzuje se, že tento druh je vektorem fytoplazmy žloutenky aster, jelikož v něm byly tyto fytoplazmy detekovány (Krüger *et al.*, 2011).

3.6.5 Hmyzí vektor – *Anaceratagallia ribauti*

Anaceratagallia ribauti patří do řádu *Hemiptera*, podřádu *Cicadomorpha*, nadčeledi *Cicadomorpha*, čeledi *Cicadellidae*, podčeledi *Agallinae*, rodu *Anaceratagallia* a druhu *ribauti* (<http://www.faunaeur.org>).

Dospělci se vyskytují od února do srpna, přezimují jen oocyty. *Anaceratagallia ribauti* se vyskytuje na slunných, suchých až vlhkých, bazických až kyselých substrátech, hlavně na rozrušených, spásaných až udusaných zatravněných polích, loukách a v okolí cest. Většina populací žije na *Plantago lanceolata* a *P. major*, ale v laboratorních podmínkách často žije i na dvouděložných rostlinách jako *Medicago*, *Trifolium* a *Onobrychis* (Nickel *et al.*, 2003).

3.6.6 Potvrzení, že *Anaceratagallia ribauti* je vektorem

Fytoplazmy stolburu byly identifikovány ve velkém množství volně rostoucích i pěstovaných rostlin. V révě vinné indukují nemoc Bois noir, která je velmi rozšířená ve středomoří a ve zbytku Evropy. Bois noir se šíří velmi účinně díky svým hostitelům, jimiž jsou jak rostliny, tak i hmyzí vektory. Všichni známí nebo možní hmyzí vektorů se živí floémem rostlin a patří do podřádu *Auchenorrhyncha*. Předpokládá se, že hlavními zdroji infekce jsou *Urtica dioica* a *Convolvulus arvensis*. Pokud se hmyz, který se živil na těchto infikovaných rostlinách, začne živit na révě vinné, dochází k přenosu fytoplazmy a následnému rozvoji nemoci. Přirozeným vektorem fytoplazmy stolburu byla identifikována čeleď *Cixiidae*. *Hyalestes obsolentus* přenáší nemoc Bois noir na révu vinnou, *Pentastiridius* sp. přenáší fytoplazmu stolburu na cukrovou třtinu. V některých částech Evropy hmyzí jedinci patřící do čeledi *Cixidae* nebyli nalezeni, avšak výskyt Bois Noir byl na vinicích i přesto vysoký. Úspěšný *in vitro* přenos fytoplazmy stolburu na révu vinnou byl pozorován nejen u čeledi *Cixidae*, ale i u druhu *Euscelis* z čeledi *Cicadellidae*.

Experimenty s přenosem fytoplazmy stolburu byly prováděny se třemi druhy potenciálních vektorů, a to *Anaceratagallia ribauti*, *Dryodurgades reticulatus* a *Euscelis incisus*.

Živí dospělci byli sbíráni ve vinici, u které bylo prokázáno, že se v ní vyskytuje choroba Bois noir. Tito dospělci byli přeneseni na semenáčky bobu *Vicia faba* (stádium se dvěma listy), na tyto semenáčky byly nasazeny cylindrické klece, díky kterým se jedinci nemohli vzdálit z této rostliny. Rostliny bobu (*Vicia faba*) rostly v růstové komoře při 23 °C. Po dobu pěti týdnů se na nich živil hmyzí jedinci. Po této době se rostlina vizuálně zhodnotila, zda nese znaky nemoci a také se na těchto rostlinách provedla i analýza PCR.

Podobný experiment byl proveden s jedinci odchovanými v laboratoři. Odchované nymfy *Anaceratagallia ribauti*, *Dryodurgades reticulatus* a *Euscelis incisus* byly přeneseny do čtvercových izolátorů na stolburem infikované rostliny bobu (*Vicia faba*) a svlačce (*Convolvulus arvensis*). Po akvizičním sání byly přeneseny na zdravé rostliny a následně testovány podobně jako ve výše uvedeném případě.

U pěti ze čtyřiceti případů byl pozorován přenos způsobený *Anaceratagallia ribauti* nachytanými na poli. *Anaceratagallia ribauti* odchovaná v laboratorních

podmínkách přenesla fytoplazmu stolburu 7 krát ze 23 případů. Dospělci *Anaceratagallia ribauti* přenesli fytoplazmu stolburu v jednom ze 13 případů. U zbylých dvou druhů *Dryodurgades reticulatus* a *Euscelis incisus* nebyl přenos fytoplazmy potvrzen.

Na základě těchto výsledků bylo potvrzeno, že *Anaceratagallia ribauti* přenáší fytoplazmu stolburu na *Vicia faba*. Přenos fytoplazem stolburu byl pozorován jednak u jedinců odchovaných v laboratorních podmínkách, ale i u jedinců nachytaných ve vinici. Z toho můžeme usuzovat, že *Anaceratagallia ribauti* není jen experimentálním, ale i přirozeným vektorem těchto fytoplazem, avšak efektivita přenosu se u těchto dvou skupin velice liší (Riedle-Bauer *et al.*, 2008).

3.6.7 Potenciální vektory

Jelikož jsou fytoplazmy hmyzem přenosné floémem limitující patogeny rostlin, které způsobují stovky nemocí rostlin na celém světě, je velmi důležité objasnit, které druhy hmyzu jsou vektory a tyto druhy dále zkoumat. Fytoplazmy napadají především révu vinnou, zeleninu a ovoce. Nedávno bylo v Srbsku zjištěno, že symptomy napadení fytoplazmami vykazuje mrkev (Drobnjankovic *et al.*, 2011), réva vinná v Rakousku (Riedle-Bauer *et al.*, 2006) i Makedonii (Atanasova *et al.*, 2010). Mrkev byla napadena různými podskupinami stolburu a žloutenkou aster, přesněji 16Srl a 16Sr-XII skupinami. Fytoplazmy žloutenky aster mají rozsáhlou škálu hostitelů a jsou přenášeny hmyzími jedinci z čeledí *Cicadellidae* a *Cixiidae*. Fytoplazmy stolburu jsou zřejmě přenášeny jedinci z 44 čeledí *Cixiidae* (Drobnjankovic *et al.*, 2011). Ve vinicích rostly *Convolvulus arvensis* a *Urtica dioica*. Tyto dvě rostliny jsou považovány za rezervoár fytoplazem (Riedle-Bauer *et al.*, 2006).

U odchycených hmyzích jedinců byla odhalena přítomnost fytoplazem, rovněž byli odhaleni i potencionální hmyzí vektoři. Na tomto poli byli identifikováni již čtyři známí vektoři žloutenky aster – *Anaceratagallia laevis*, *Macrosteles laevis*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Macrosteles sexnotatus* (Drobnjankovic *et al.*, 2011). V letech 2004 a 2005 bylo v rakouských vinicích odchyceno jen několik jedinců *Hyaslestes obsolentus*. Z toho důvodu se domníváme, že fytoplazmy stolburu a žloutenky aster přenáší i další hmyzí vektoři (Riedle-Bauer *et al.*, 2006).

V letech 2005 a 2006 byl prováděn výzkum na vinicích v Makedonii. Bylo identifikováno 27 druhů patřících do podřádů *Fulgomorpha* a *Cicadomorpha*, šesti čeledí *Cicadellidae*: *Fieberiella florii*, *Megophthalmus scabripennis*, *Eupterix* sp., *Zyginidia scutellaris*, *Zygina* sp., *Platymethopius* sp., *Neotalitrus fenestratus*, *Anaceratagallia ribauti*, *Delphax* sp., *Allygidius* sp., *Dictyophara europaea*, *Platymethopius guttatus*, *Cosmotettix* sp., *Phlepsius intricatus*, *Psammotettix alienus*, *Hardya tenis*, *Selenocephalus* sp., *Selenocephalus obsoletus*, *Opsius stactogalus*, *Cixius remotes*, *Cixius simplex*, *Cixius heydenii*, *Stictocephala bisonia*, *Typhlocyba* spp., *Allygus modestus*, *Empoasca vitis*, *Empoasca* spp. Populace sledovaných druhů dosahují maxima v červnu a poté od poloviny července do konce září (Atanasova et al., 2010). Molekulární analýzy odebraných jedinců z čeledi *Cicadellidae* a rostlin v jižní Bačce v Srbsku potvrdily přítomnost žloutenky aster (16Srl) a stolburu (16SrXII). V roce 2008 byla monitorována oblast jižní Bačky na přítomnost hmyzích vektorů fytoplazem žloutenky aster a stolburu z čeledi *Cicadellidae* a *Cixiidae*. Dospělci byli identifikováni a dále testováni na přítomnost fytoplazem molekulárními metodami, které zahrnovaly PCR a RFLP analýzu. Bylo identifikováno 13 druhů z čeledi *Cicadellidae*, *Anaceratagallia ribauti*, *Anaceratagallia venosa*, *Anaceratagallia laevis*, *Psammotettix confinis*, *Psammotettix striatus*, *Psammotettix alienus*, *Macrosteles sexnotatus*, *Ophiola decumana*, *Errastunus ocellaris* Fallén, *Scaphoideus titanus* Ball, *Eupteryx atropunctata*, *Eupteryx mellisae* Curtis, *Zyginidia pullula*. Fytoplazmy stolburu byly zjištěny v *Anaceratagallia laevis*, *Anaceratagallia ribauti*, *Anaceratagallia venosa*, *Psammotettix striatus*, *Psammotettix confinis* a *Psammotettix alienus*. Žloutenka aster podskupina 16Srl-A byla identifikována v *Anaceratagallia laevis*, *Ophiola decumana*, *Psammotettix confinis*, zatímco podskupina 16Srl-C byla identifikována jen v *Psammotettix confinis* (Drobnjankovic et al., 2011). Na vinicích v Rakousku se objevovali i další hmyzí jedinci, kteří by mohli být hmyzími vektory fytoplazem: *Macrosteles laevis*, *Macrosteles cristatus*, *Anoptettix fuscovenosus*, *Dryodurgades reticularis* a *Reptalus panzeri* (Riedle-Bauer et al., 2006).

Od doby, kdy bylo potvrzeno, že jedinci z rodů *Anaceratagallia* a *Psammotettix* byli infikováni fytoplazmami stolburu a žloutenky aster, se začalo předpokládat, že hrají významnou roli v přenosu a rozšiřování těchto patogenů v přirozeném prostředí, jelikož během celého vegetačního období se hojně nacházeli na polích s mrkví, která vykazovala symptomy napadení fytoplazmou

(Drobnjankovic *et al.*, 2011). Díky práci Riedle-Bauer *et al.* (2008) bylo potvrzeno, že *Anaceratagallia ribauti* je hmyzím vektorem fytoplazmy stolburu.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

Pro experimentální část byl vybrán hmyzí vektor *Anaceratagallia ribauti*. Hmyzí jedinci pocházeli celkem ze tří lokalit Lednice, Perná a Březí. Sběry hmyzu se prováděly periodicky v období od června do září ve třech po sobě jdoucích letech 2010, 2011 a 2012. Hmyzí jedinci byli odchyceni RNDr. Pavlem Lautererem a Mgr. Martinem Starým, kteří hmyzí jedince taktéž identifikovali. Jedinci byli dlouhodobě uchováváni ve 100% etanolu při -20 °C.

4.2 Izolace DNA

Z jedinců hmyzího vektoru *Anaceratagallia ribauti* byla vyizolována celková DNA pomocí komerčně dostupné soupravy Wizard genomic DNA Purification Kit (Promega).

1. Jedinec hmyzu byl rozetřen pomocí plastového homogenizátoru v 1,5ml mikrozkuhavce ve 200 µl lyzačního pufru (Nuclei lysis solution).
2. Získaný lyzát byl inkubován 15 minut při 65 °C, po 7 minutách byl protřepán na třepačce.
3. Před dalším zpracováním byl ponechán 5 min při pokojové teplotě.
4. K lyzátu byly přidány 3 µl RNázy (RNase solution) a obsah byl promíchán obrácením mikrozkuhavky (25x). Směs byla krátce centrifugována.
5. Následovala inkubace 15 min při 37 °C.
6. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 min.
7. Ke směsi bylo přidáno 67 µl srážecího pufru (Protein precipitation solution).
8. Následovalo třepání na vortexu po dobu 20 sekund při 1 600 kmitech.
9. Mikrozkuhavka byla chlazená 5 minut na ledu.
10. Byla provedena centrifugace po dobu 4 min při 13 000 g a pokojové teplotě, vysrážené proteiny vytvořily bílý pelet.
11. Do stojánku byly připraveny čisté mikrozkuhavky s 200 µl isopropanolu.
12. Opatrně, bez narušení peletu, byl do čisté mikrozkuhavky s isopropanolem odpipetován supernatant obsahující DNA.
13. Obsah byl opatrně promíchán převrácením (5x) a umístěn do -20 °C na noc.

14. Byla provedena centrifugace při pokojové teplotě po dobu 1 min při 13 000 g. Vysrážená DNA vytvořila malý pelet.
15. Supernatant byl opatrně odstraněn vylitím.
16. K peletu bylo přidáno 200 μ l 70% etanolu a opatrným převrácením byl pelet opláchnut.
17. Následovala centrifugace při pokojové teplotě na 1 min při 13 000 g.
18. Etanol byl odstraněn a mikroskopické skúmavky s pelety DNA byly usušeny na filtračním papíře.
19. DNA byla vysušena v centrifugační odparce při 45 °C po dobu 30 minut.
20. Sediment DNA byl rozpuštěn ve 30 μ l pufru (Rehydration solution) na třepačce při 65 °C po dobu 10 minut.
21. Vyizolovaná DNA byla uchována při -20 °C.

4.3 PCR amplifikace a detekce PCR produktů

4.3.1 Nested PCR

Nested PCR je modifikací PCR. Postup je však velmi podobný. Zásadním rozdílem mezi klasickou PCR a nested PCR je, že amplifikace DNA neprobíhá v jednom, ale ve dvou krocích. Nejprve byla připravena reakční směs se vzorky izolované DNA pro první krok reakce (viz první stupeň) a byla provedena PCR reakce dle definovaných podmínek pro primery P1 a P7 (viz tabulka č. 2). Poté byla připravena reakční směs pro druhý stupeň reakce (viz druhý stupeň) a byla provedena PCR dle definovaných podmínek pro primery R16F2 a R16R2 (viz tabulka č. 5).

První stupeň

1. Reakční směs byla připravena na ledu v 1,5ml mikroskopické skúmavce dle tabulky č. 1, poté byla rozpipetována do jednotlivých 0,2ml PCR mikroskopických skúmavek. Pro PCR amplifikaci byly použity primery P1 a P7, sekvence primerů je uvedena v tabulce č. 3.

Tabulka č. 1: Příprava reakční směsi pro první krok nested PCR.

<i>položka</i>	<i>koncentrace prac. roztoku</i>	<i>konečná koncentrace</i>	<i>1 test (μl)</i>	<i>14 testů (μl)</i>
pufr	5x	1x	5	70
voda			17,3	242,2
f primer P1	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25	3,5
r primer P7	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25	3,5
Taq pol	5 U/ μl	1 U/reakce	0,2	2,8
CELKEM			23	322
objem reakce		25 μl	rozpipetovat po 23 μl	
vzorek		2 μl		

- Po napipetování premixu a vzorku do mikrozkušavek na PCR byla směs zcentrifugována a byla vložena do termocykléru.
- Časový a teplotní profil prvního stupně nested PCR s primery P1/P7 znázorňuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Časový a teplotní profil prvního stupně nested PCR s primery P1/P7.

krok PCR	teplota	čas	opakování
predenaturace	95°C	2 minuty	1x
denaturace	95°C	1 minuta	35x
annealing	55°C	2 minuty	
elongace	72°C	3 minuty	
finální elongace	72°C	10 minut	1x

Tabulka č. 3: Sekvence primerů P1 a P7 (Deng *et Hirugi*, 1991; Schneider *et al.*, 1995).

<i>název primeru</i>	<i>nukleotidová sekvence</i>
P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'

Druhý stupeň

- Do mikrozkušavek pro PCR bylo na ledu napipetováno 78 μl vody a 2 μl vzorku z předchozího kroku (produkt P1/P7).

2. Reakční směs byla připravena podle tabulky č. 4, poté byla reakční směs rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek pro PCR. Pro PCR reakci byly použity primery R16F2 a R16R2, sekvence primerů je uvedena v tabulce č. 6.
3. Časový a teplotní profil prvního stupně nested PCR s primery R16F2/R16R2 znázorňuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 4: Příprava reakční směsi pro druhý krok nested PCR.

<i>položka</i>	<i>koncentrace prac. roztoků</i>	<i>konečná koncentrace</i>	<i>1 test (μl)</i>	<i>14 testů (μl)</i>
pufr	5x	1x	5	70
voda			17,3	242,2
f primer R16F2	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25	3,5
r primer R16R2	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25	3,5
Taq pol	5 U/μl	1 U/reakce	0,2	2,8
CELKEM			23	322
objem reakce		25 μl	rozpipetovat po 23 μl	
vzorek	2 μl (40x ředěný PCR produkt P1/P7)			

4. Po napipetování reakční směsi a vzorku do mikrozkušavek pro PCR byla směs centrifugována a vzorky byly vloženy do termocykléru.

Tabulka č. 5: Časový a teplotní profil nested PCR s primery R16F2/R16R2 – první stupeň.

<i>krok PCR</i>	<i>teplota</i>	<i>čas</i>	<i>opakování</i>
predenaturace	94°C	2 minuty	1x
denaturace	94°C	1 minuta	35x
annealing	50°C	1 minuta	
elongace	72°C	1 minuta	
finální elongace	72°C	10 minut	1x

Tabulka č. 6: Sekvence primerů R16F2 a R16R2 (Gundersen *et* Lee, 1996; Lee *et al.*, 1993).

<i>název primeru</i>	<i>nukleotidová sekvence</i>
R16F2	5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3'
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

4.3.2 Elektroforéza PCR produktu

Produkty nested PCR byly vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu, který byl připraven podle níže uvedeného návodu.

1. V mikrovlnné troubě byly rozvařeny 3 g agarózy ve 300 ml TAE pufru.
2. 50 ml rozvařené agarózy bylo přelito do kádinky a bylo přidáno 3 μ l Good view.
3. Byla připravena vanička (10 x 10 cm) na horizontální elektroforézu, čela byla pečlivě přelepena izolepou a byl vsazen hřebínek. Vanička byla umístěna na vodorovnou plochu.
4. Do takto připravené vaničky byla nalita agaróza.
5. Po ztuhnutí gelu byla izolepa odlepena, byl opatrně vyjmut hřebínek a vanička byla vložena do elektroforetické komůrky. Komůrka byla naplněna TAE pufrem tak, aby byl gel převrstven 2 až 5 mm pufru.
6. Vzorky byly před pipetováním centrifugovány.
7. Vzorek pro analýzu byl připraven smícháním 2 μ l nanášecího pufru a 3 μ l vzorku. Jednotlivé kapky nanášecího pufru byly napipetovány na parafilm.
8. Mikropipetou byly do jamek v gelu napipetovány vzorky. Vzorky byly nanášeny zleva doprava a rozmístění vzorků bylo zaznamenáno do protokolu, jako první byl umístěn standard molekulové váhy.
9. Poté byl zdroj stejnosměrného proudu nastaven na napětí 60 – 80 V.
10. Napětí bylo vypnuto, když byla bromfenolová modř téměř na konci gelu.
11. Vanička byla i s gelem opatrně vyjmuta z elektroforetické komůrky.
12. Gel byl opatrně vysunut z vaničky na skleněnou plochu transluminátoru.
13. Gel byl vyfocen a elektroforetogram byl uchován pro další zpracování výsledků.

4.4 RFLP analýza

4.4.1 RFLP

Vzorky, které byly pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu vyhodnoceny jako pozitivní, byly použity k RFLP analýze. Metoda RFLP využívá restriční endonukleázy, které štěpí DNA molekuly v přesných místech tzv. restričních bodech a vznikají specifické fragmenty, které jsou detekovány pomocí elektroforézy.

1. V mikrozkušavkách s PCR produkty byly na ledu přidány restriční enzymy *MseI* a *RsaI*. K směsi PCR produktů a restričních enzymů byly přidány jejich pufrы NEBuffer 2 pro *MseI* a RSA1 pufr pro *RsaI*.
2. Dle tabulky č. 7 byla napipetována reakční směs a poté rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek.

Tabulka č. 7: Rozpis reakční směsi na RFLP.

<i>položka</i>	<i>1 test (μl)</i>	<i>8 testů (μl)</i>
pufr	1,3	10,4
BSA 10x	1,3	10,4
voda	5,2	41,6
RE	0,2	1,6
CELKEM	8	64
objem reakce	rozpípetovat po 8 μl	
vzorek	5 μl	
celkový objem	13 μl	

3. Po napipetování reakční směsi a vzorku do mikrozkušavek pro PCR byla směs zcentrifugována.
4. Vzorky byly vloženy do termocykléru a restrikce probíhala 16 hodin při 37 °C.

4.4.2 Vyhodnocení RFLP analýzy

Produkty vzniklé pomocí metody RFLP byly vyhodnoceny na 2,5% agarózovém gelu. Výsledky byly porovnány se standardy a byl určen typ fytoplazmy.

1. V mikrovlnné troubě bylo rozvařeno 7,5 g agarózy ve 300 ml TAE pufru.
2. Poté bylo 50 ml rozvařené agarózy přelito do kádinky a bylo přidáno 3,5 μl Gel red.
3. Byla připravena vanička (10 x 10 cm) na horizontální elektroforézu, čela byla pečlivě přelepena izolepou a byl vsazen hřebínek. Vaničku bylo nutné umístit na vodorovnou plochu.
4. Do takto připravené vaničky byla nalita agaróza.
5. Po ztuhnutí gelu byla izolepa odlepena, opatrně byl vyjmut hřebínek a vanička byla vložena do elektroforetické komůrky. Komůrka byla naplněna TAE pufrém tak, aby byl gel převrstven 2 až 5 mm pufru.
6. Vzorky byly před pipetováním centrifugovány.

7. Vzorek pro analýzu byl připraven smícháním 2,5 μ l nanášecího pufru a RFLP vzorku. Množství vzorku, který bude pipetován do gelu, se liší podle síly bandu z elektroforézy PCR produktu. Vzorku, jehož síla bandu byla rovna *** bylo pipetováno 3 μ l, ** 4 μ l, * 6 μ l, *sl 10 μ l.
8. Jednotlivé kapky nanášecího pufru byly napipetovány na parafilm a byly promíchány se vzorkem.
9. Mikropipetou byly do jamek v gelu napipetovány vzorky. Vzorky byly nanášeny zleva doprava a rozmístění vzorků bylo zaznamenáno do protokolu, jako první byl umístěn standard molekulové váhy.
10. Poté byl zdroj stejnosměrného proudu nastaven na napětí 60 V, proud na 100 mA.
11. Napětí bylo vypnuto, když byla bromfenolová modř téměř na konci gelu.
12. Vanička i s gelem byla opatrně vyjmuta z elektroforetické komůrky.
13. Gel byl opatrně vysunut z vaničky na skleněnou plochu transluminátoru.
14. Gel byl vyfocen a elektroforetogram byl uchován pro další zpracování výsledků.

4.5 Seznam použitých chemikálií

70% etanol

agaróza SERVA for DBA electrophoresis

BSA 10x

demineralizovaná voda

Good View Nucleic Acid Strain

isopropanol

ledová tříšť

MSE 1 10U/ml (Biolabs)

My Taq polymerase (Bioline)

nanášecí pufr - bromfenolová modř 0,1% v 30% glycerolu

primer R16F2 (5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3')

primer P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3')

primer P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3')

primer R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3')

pufr 5x My Taq Reaction Buffer (Bioline)

pufr Buffer C 10x Promega

pufr NEBuffer 2 10x Biolabs

RSA1 10u/μg Promega

standard molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp plus DNA

taq polymeráza My taq DNA polymerase 5U/μl (Bioline)

Wizard genomic DNA Purification Kit (Rehydration solution, Nuclei lysis solution, RNase A solution, protein precipitation solution) (Promega)

50 x TAE pufr

TRIS	242 g
------	-------

rozpustit v 500 ml destilované vody

0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)	100 ml
-------------------------------------	--------

ledová kyselina octová	57,1 ml
------------------------	---------

doplnit objem destilovanou vodou na 1 000 ml

před použitím 50x zředit

10x TBE pufr

Tris-base	108 g
-----------	-------

kyselina boritá	55 g
-----------------	------

Na ₂ -EDTA	9,3 g
-----------------------	-------

doplnit objem destilovanou vodou na 1 000 ml

4.6 Přístrojové vybavení laboratoře

centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet international Inc.)

centrifugační odparka SPD Speed Vac thermosavant

elektroforetická vanička (Fisherbrand)

laminární box Telstar PV-100

mikrovlnná trouba

minicentrifuga E centrifuge (WEALTEC)

mrazící box General frost

nanodrop 1000 (Thermoscientific)

stolní počítač (Hewlett-Packard)

termoblok techne dri-block DB-D

termocycler cyklér T gradient (Biometra)

transluminátor G:Box (Syngene)
třepačka mixing block MB-102 (BIOER)
váhy A a D EK 200G
vortex Maneco MS1 minishaker IKA
zdroj stejnosměrného proudu Powerpack P25 (Biometra)

4.7 Seznam použitých pomůcek

automatické pipety
filtrační papír
hřebínek na elektroforézu
chemická lžička
kádinky
kovový blok (Corbett Research)
lihový fix
mikrozkumavky
odměrný válec
ochranné rukavice
parafilm American national CAM
PCR mikrozkumavky
pinzeta
plastový homogenizátor
silikonová chňapka
skleněná zásobní láhev (Fisherbrand)
sterilní špičky
stojánek na mikrozkumavky
stříčka
vanička na led
váženka

5 Výsledky

V experimentální části byla úspěšně vyizolována DNA z celkem 139 jedinců *Anaceratagallia ribauti* (tabulka č. 8). Dalším krokem bylo spektrofotometrické stanovení koncentrace izolované DNA a její čistoty. Průměrná koncentrace DNA ve vzorcích byla 109,42 ng/μl a A260/A280 dosahovala hodnot 1,61 – 2,37.

Tabulka č. 8: Výsledky PCR amplifikace a RFLP identifikace fytoplazem.

číslo vzorku	pohlaví	nested PCR	RFLP
279/1	F	0	
279/2	F	0	
279/3	F	0	
279/4	F	0	
279/5	M	0	
279/6	M	0	
279/7	M	0	
279/8	M	1	STOL
279/9	M	0	
279/10	F	0	
279/11	M	1	AY
279/12	M	1	STOL
279/13	M	0	
279/14	M	0	
279/15	M	1	STOL
279/16	M	0	
279/17	M	0	
279/18	M	0	
279/19	M	0	
279/20	M	0	
279/21	F	0	
279/22	F	1	STOL
279/23	M	0	
279/24	F	1	NS
383/1	F	0	
383/2	F	0	
383/3	F	0	
383/4	F	0	
383/5	F	0	
383/6	F	0	
383/7	F	1	NS
383/8	F	1	NS
383/9	F	1	NS

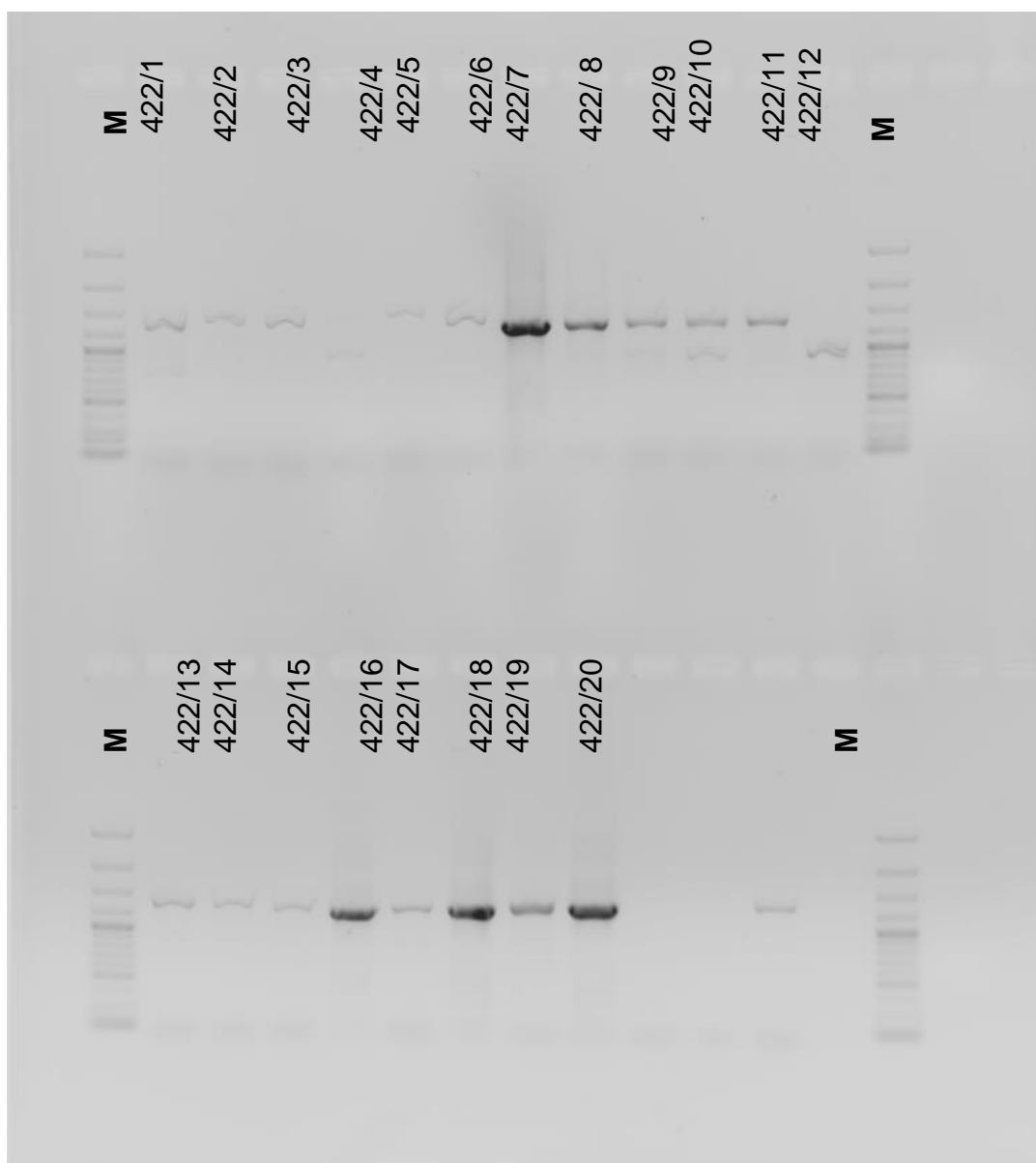
<i>číslo vzorku</i>	<i>pohlaví</i>	<i>nested PCR</i>	<i>RFLP</i>
383/10	F	1	NS
383/11	F	0	
383/12	F	1	NS
383/13	F	1	NS
383/14	F	0	
383/15	F	1	NS
383/16	F	0	
383/17	F	1	NS
383/18	F	0	
383/19	F	1	NS
383/20	F	0	
414/1	F	0	
414/2	F	0	
414/3	M	0	
414/4	M	0	
414/5	M	0	
414/6	L	0	
418/1	F	1	NS
418/2	F	1	NS
418/3	F	1	NS
418/4	F	1	NS
418/5	F	1	NS
418/6	F	1	NS
418/7	F	1	NS
418/8	F	1	NS
418/9	M	1	NS
418/10	M	1	NS
418/11	M	1	NS
418/12	M	1	NS
422/1	M	0	
422/2	M	0	
422/3	M	0	
422/4	M	0	
422/5	M	0	
422/6	M	0	
422/7	M	1	NS
422/8	F	1	STOL
422/9	F	1	NS
422/10	F	0	
422/11	F	0	
422/12	F	0	

<i>číslo vzorku</i>	<i>pohlaví</i>	<i>nested PCR</i>	<i>RFLP</i>
422/13	M	0	
422/14	M	0	
422/15	M	0	
422/16	M	1	STOL
422/17	M	0	
422/18	M	1	STOL
422/19	M	1	NS
422/20	M	1	STOL
423/1	F	0	
423/2	M	0	
423/3	M	1	STOL
423/4	M	1	STOL
423/5	M	0	
423/6	M	0	
423/7	F	0	
423/8	F	0	
423/9	F	0	
423/10	F	0	
423/11	F	0	
423/12	F	0	
423/13	F	1	STOL
423/14	L	0	
423/15	F	0	
423/16	F	0	
423/17	F	1	STOL
423/18	F	0	
423/19	F	1	STOL
423/20	F	0	
424/1	M	0	
424/2	M	1	STOL
424/3	M	1	STOL
424/4	M	1	STOL
424/5	M	0	
424/6	M	1	STOL
424/7	M	1	AY
424/8	M	1	AY
424/9	F	0	
424/10	F	0	
424/11	F	0	NS
424/12	F	1	STOL
424/13	F	0	

<i>číslo vzorku</i>	<i>pohlaví</i>	<i>nested PCR</i>	<i>RFLP</i>
424/14	F	0	NS
424/15	F	1	AY
424/16	F	0	
424/17	F	0	
424/18	F	1	NS
424/19	F	0	
424/20	M	0	
425/11	M	1	STOL
425/12	M	0	
425/13	M	0	
425/14	L	1	NS
425/15	L	0	NS
425/16	L	0	
425/17	F	1	NS
425/18	F	1	NS
425/19	F	0	
425/20	F	0	
428/6	L	0	
428/7	F	1	STOL
428/8	F	0	
428/9	F	0	
428/10	F	1	STOL
440/1	M	0	
440/2	M	0	

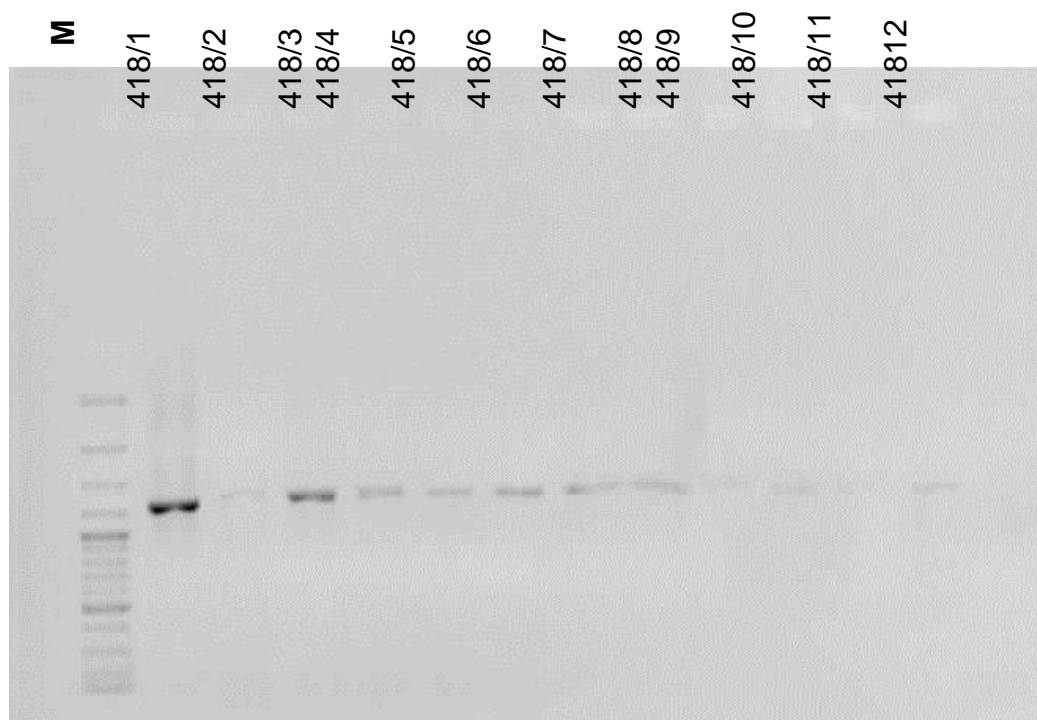
M – samec, F – samice, L – larva, 1 – pozitivní výsledek, 0 – negativní výsledek, STOL – fytoplazma stolburu, AY – fytoplazma žloutenky aster, NS – nespecifický produkt.

Následně byla provedena detekce fytoplazem ve vzorcích pomocí nested PCR a jejich identifikace na základě RFLP analýzy získaných PCR produktů. V prvním kroku byly použity primery P1 a P7, v druhém kroku nested PCR byly použity primery R16F2 a R16R2. Při této velmi citlivé reakci došlo k amplifikaci DNA v 56 případech, shrnuto v tabulce č. 8. Specifita reakce a identifikace fytoplazem byla ověřena pomocí RFLP analýzy. Výsledky nested PCR reakce zobrazují obrázky č. 1 a 2.



Obrázek č. 1: Elektroforetogram produktů nested PCR série 422/1-20 v 1% agarózovém gelu.

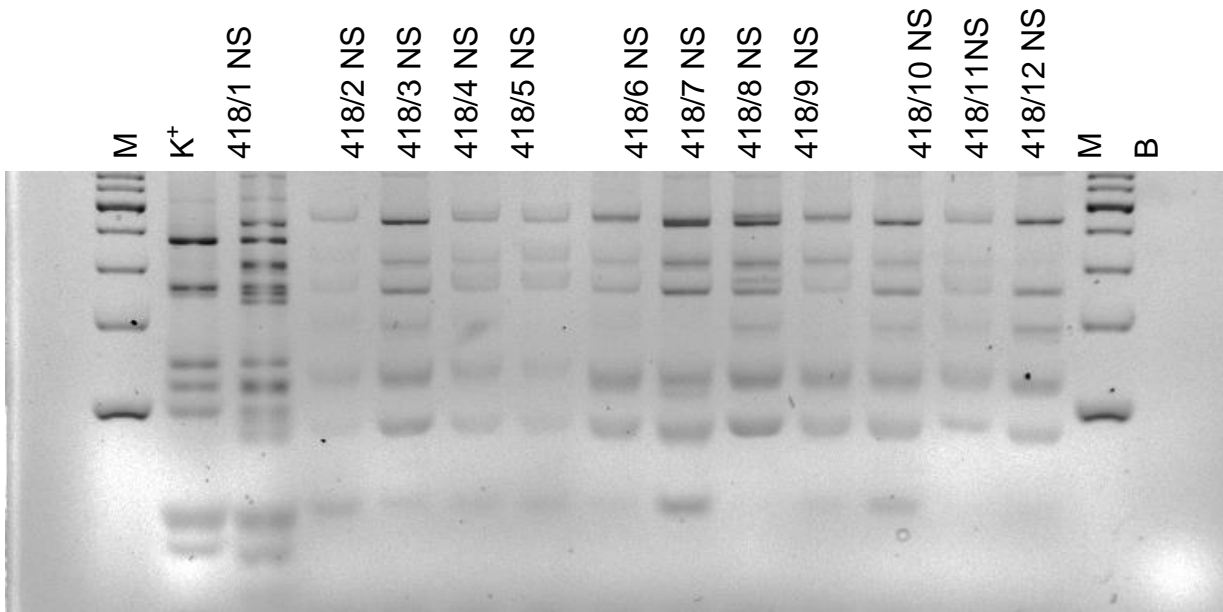
M – standard molekulové hmotnosti.



Obrázek č. 2: Elektroforetogram produktů nested PCR série 418/1-12 v 1% agarózovém gelu.

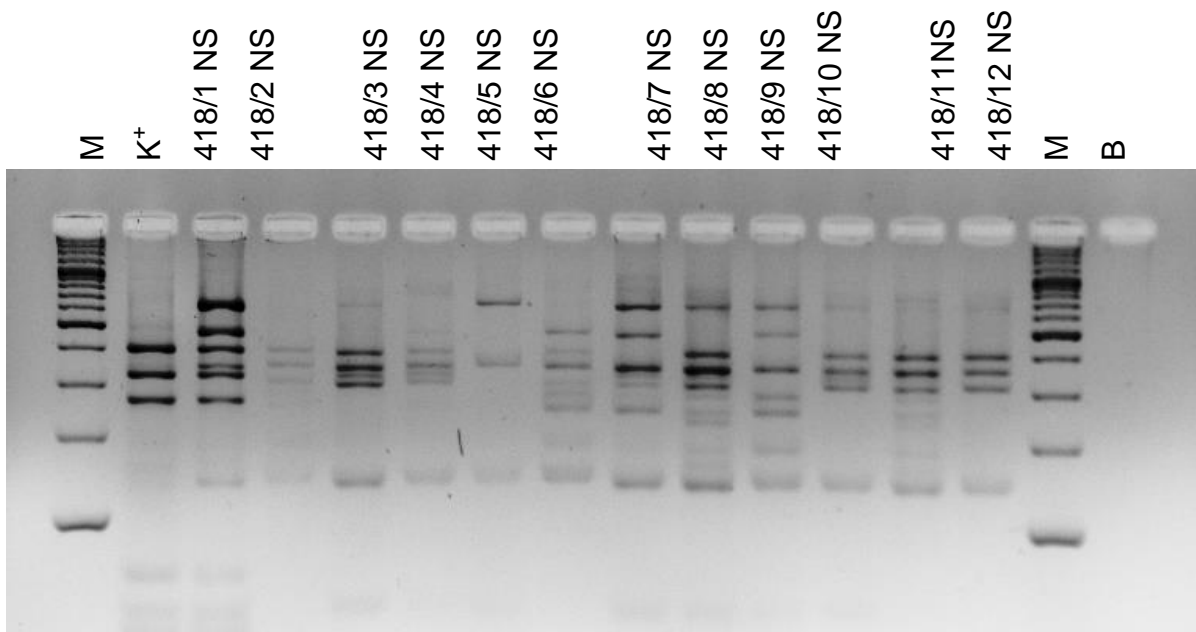
M – standard molekulové hmotnosti.

Pozitivní vzorky byly analyzovány pomocí RFLP analýzy (viz tabulka č. 8). Ve vzorcích se vyskytovaly především fytoplazmy stolburu a žloutenky aster, avšak některé vzorky poskytly nespecifické výsledky. Ukázka elektroforetogramu viz obrázky č. 3, 4, 5 a 6.



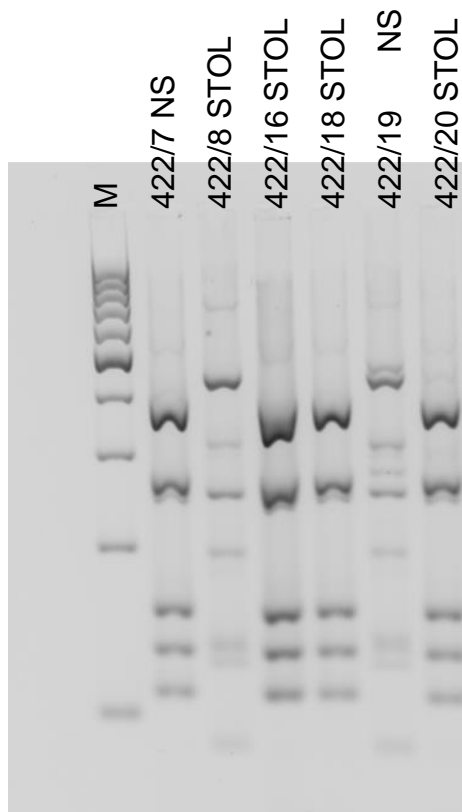
Obrázek č. 3: Elektroforetogram produktů RFLP analýzy série 418/1-12 ve 2,5% agarózovém gelu restriční endonukleáza *MseI*.

M – standard molekulové hmotnosti, K⁺ – pozitivní kontrola fytoplazma stolburu, 6 μl, B – bromfenolová modř, NS – nespecifický produkt.



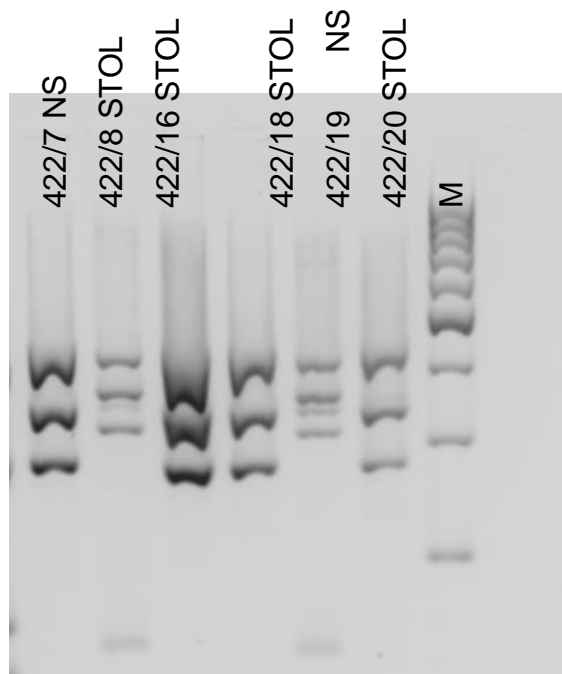
Obrázek č. 4: Elektroforetogram produktů RFLP analýzy série 418/1-12 ve 2,5% agarózovém gelu restriční endonukleáza *RsaI*.

M – standard molekulové hmotnosti, K⁺ – pozitivní kontrola fytoplazma stolburu, 6 μl, B – bromfenolová modř, NS – nespecifický produkt.



Obrázek č. 5: Elektroforetogram produktů RFLP analýzy série 422/7, 8, 16, 18, 19, 20 ve 2,5% agarózovém gelu restriční endonukleáza *MseI*.

M – standard molekulové hmotnosti, NS – nespecifický produkt, STOL – fytoplazma stolburu.



Obrázek č. 6: Elektroforetogram produktů RFLP analýzy série 418/7, 8, 16, 18, 19, 20 ve 2,5% agarózovém gelu restriční endonukleáza *RsaI*.

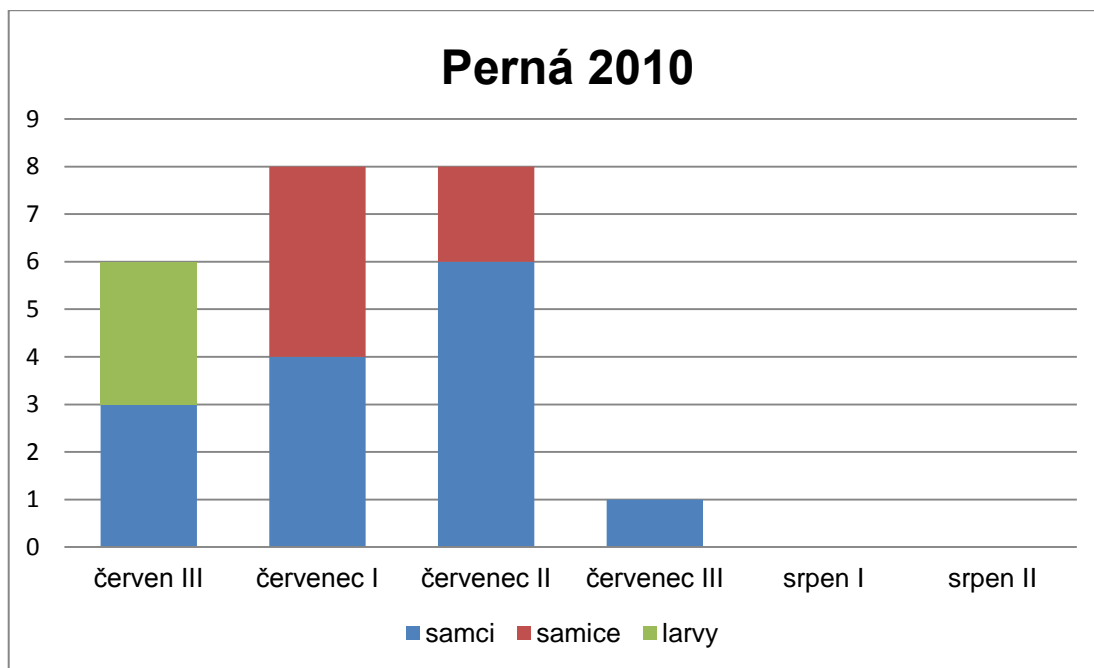
M – standard molekulové hmotnosti, NS – nespecifický produkt, STOL – fytoplazma stolburu.

Na základě výsledků PCR amplifikace a RFLP analýzy byl zjištěn počet pozitivních vzorků a typy fytoplazem. Na základě těchto výsledků bylo vyhodnoceno, v jakém období se vyskytuje nejvíce infikovaných jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Lednici, Perné a Březí.

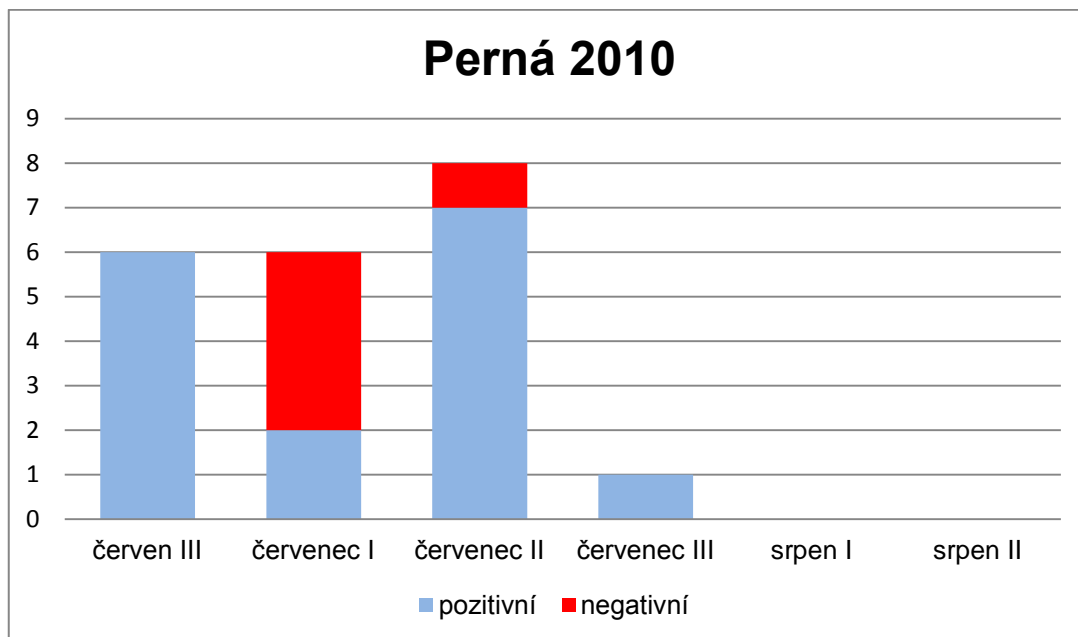
V roce 2010 bylo v Perné odchyceno celkem 23 jedinců, v třetí třetině června byli odchyceni 3 samci a 3 larvy, v první třetině července byli odchyceni 4 samci a 4 samice, v druhé třetině července bylo odchyceno 6 samců a 2 samice, ve třetí třetině července byl odchycen 1 samec a 1 larva (graf č. 1). Tři jedinci odchycení v třetí třetině června byli infikováni fytoplazmou stolburu a tři jedinci nebyli infikováni (graf č. 2). Dva jedinci odchycení v první třetině července byli infikováni fytoplazmou stolburu a čtyři jedinci nebyli infikováni (graf č. 2). Sedm jedinců odchycených v druhé třetině července bylo infikováno fytoplazmou stolburu a jeden nebyl infikován fytoplazmou (graf č. 2). Jedinec chycený v třetí třetině července byl falešně pozitivní (graf č. 2). V roce 2011 bylo v Perné celkově odchyceno 76 jedinců, v třetí třetině června bylo odchyceno 5 samců, 7 samic a 1 larva, v první třetině července bylo odchyceno 10 samců, 8 samic a 1 larva, v druhé třetině července byli odchyceni 3 samci, 7 samic a 3 larvy, ve třetí třetině července byl odchyceni 3 samci, 16 samic a 1 larva, v první třetině srpna byla odchycena 1 samice a 3 larvy, v druhé třetině srpna bylo odchyceno 7 samic (graf č. 3). Tři jedinci odchycení v první třetině července byli infikováni fytoplazmou stolburu a deset jedinců nebylo infikováno fytoplazmou (graf č. 4). Tři jedinci odchycení v první třetině července byli infikováni fytoplazmou stolburu, 9 jedinců bylo falešně pozitivních a jeden nebyl infikován fytoplazmou (graf č. 4). Dva jedinci odchyceni v druhé třetině července byli infikováni fytoplazmou stolburu a čtyři jedinci nebyli infikováni fytoplazmou (graf č. 4). Pět jedinců odchycených v třetí třetině července bylo falešně pozitivních a patnáct jedinců nebylo infikováno fytoplazmou (graf č. 4). Dva jedinci odchycení v první třetině srpna byli infikováni fytoplazmou stolburu a dva jedinci nebyli infikováni fytoplazmou (graf č. 4). Jeden jedinec odchycený v druhé třetině srpna byl infikován fytoplazmou stolburu a šest jedinců nebylo infikováno fytoplazmou stolburu (graf č. 4). V roce 2012 bylo v Perné odchyceno celkem 34 jedinců, v první třetině července bylo odchyceno 12 samců a 12 samic, v první třetině srpna bylo odchyceno 7 samců a 5 samic (graf č. 5). Sedm jedinců odchycených v první třetině července bylo infikováno fytoplazmou stolburu, tři jedinci byli infikováni fytoplazmou žloutenky aster

a čtrnáct nebylo infikováno fytoplazmou (graf č. 6). Dva jedinci odchycení v první třetině srpna byli falešně pozitivní a 10 nebylo infikováno fytoplazmou (graf č. 6).

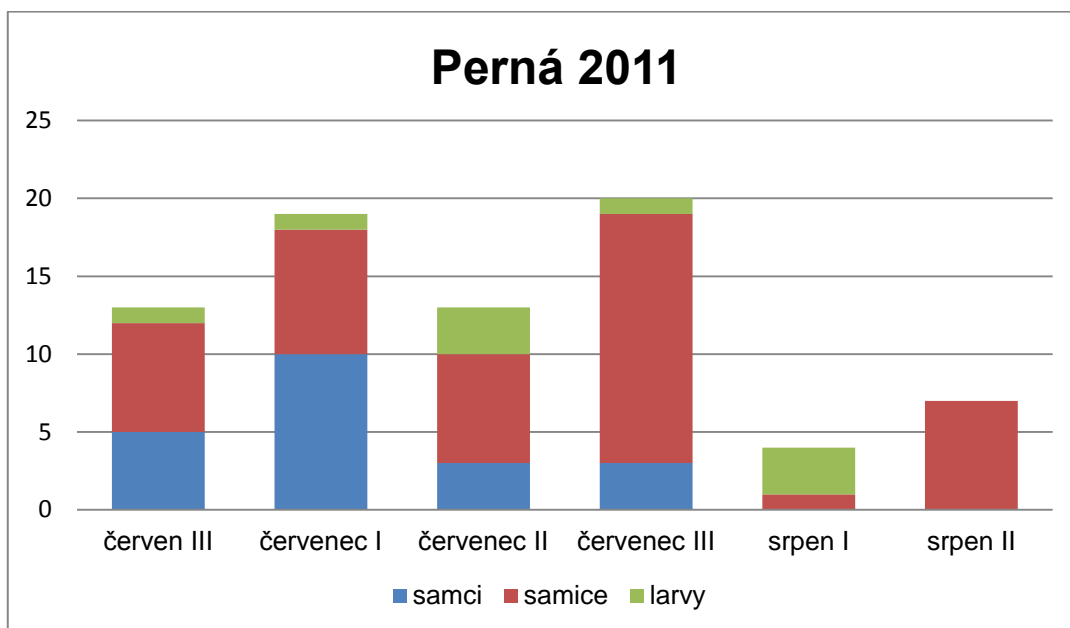
Graf č. 1: Celkový počet odchycených jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2010.



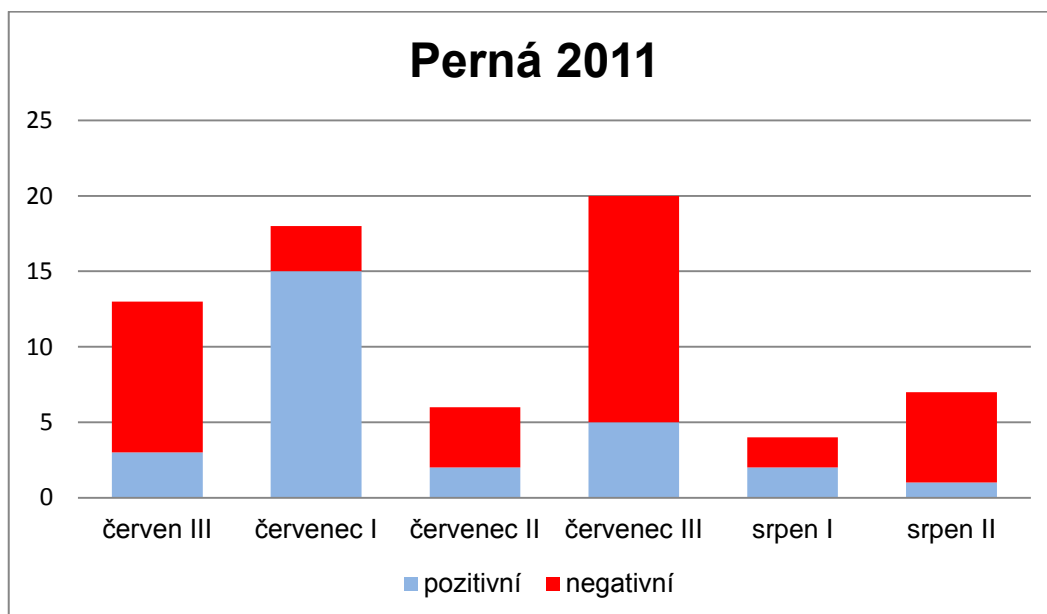
Graf č. 2: Počet infikovaných jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2010.



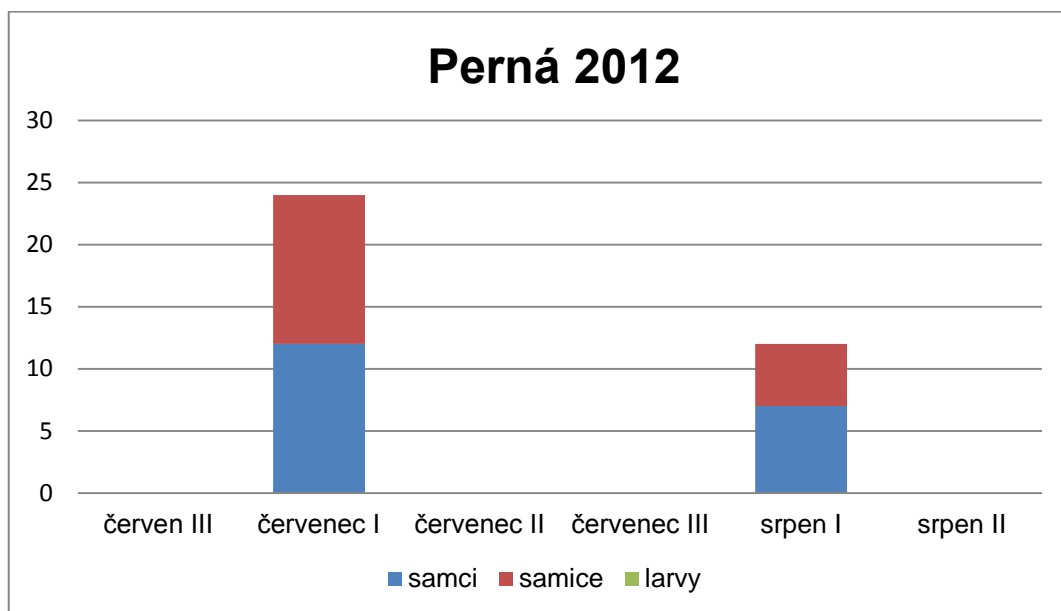
Graf č. 3: Celkový počet odchytených jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2011.



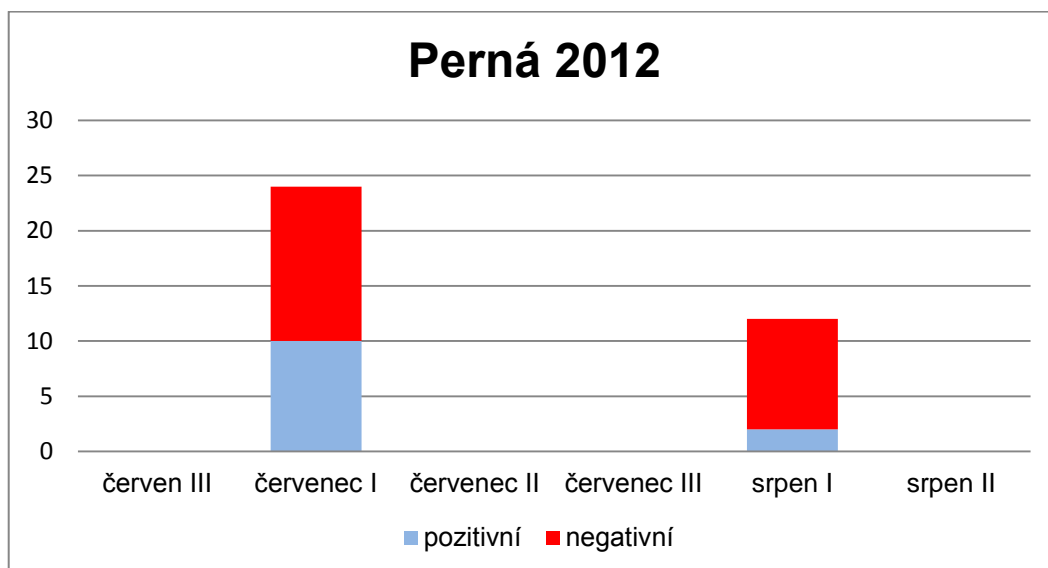
Graf č. 4: Počet infikovaných jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2011.



Graf č. 5: Celkový počet odchytených jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2012.

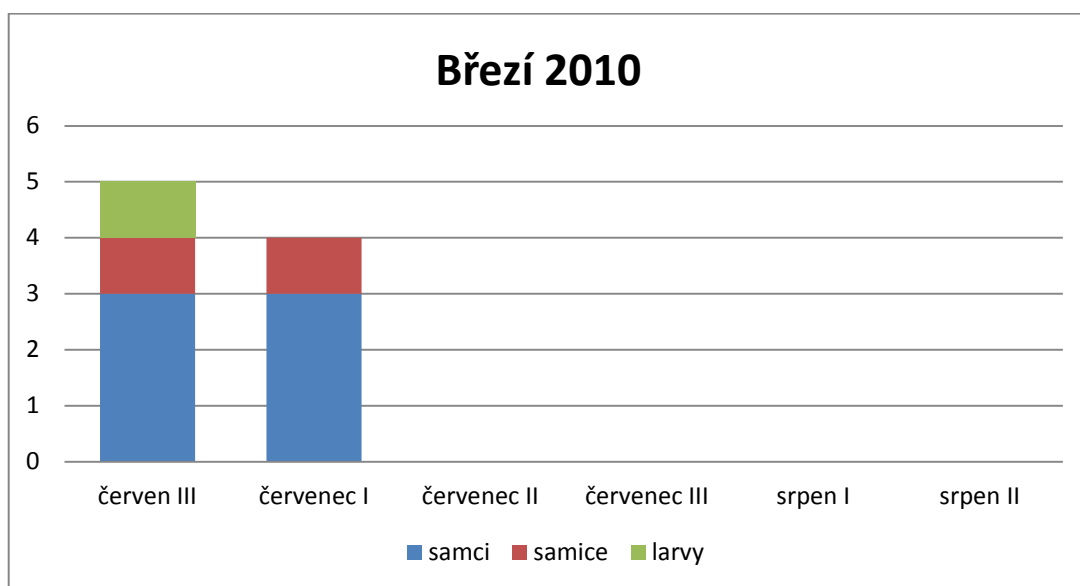


Graf č. 6: Počet infikovaných jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Perné v roce 2012.

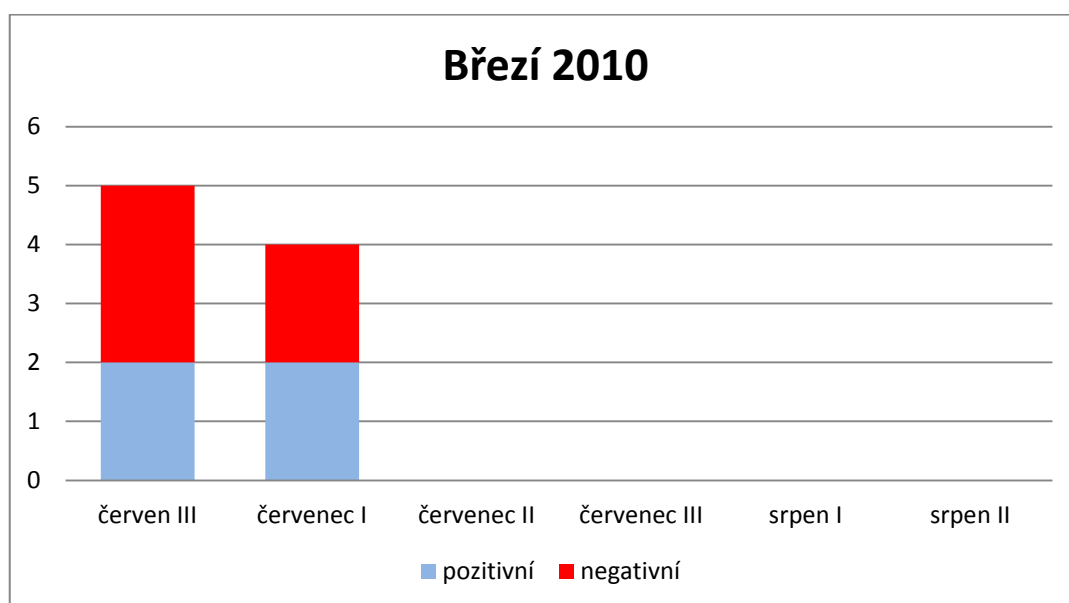


V roce 2010 bylo v Březí odchyteno celkem 9 jedinců, v třetí třetině června byli odchytení 3 samci, 1 samice a 1 larva, v první třetině července byli odchytení 3 samci a 1 samice (viz graf č. 7). Dva jedinci odchytení ve třetí třetině června byli infikováni fytoplazmou stolburu a tři nebyli infikováni fytoplazmou (viz graf. č. 8). Jeden jedinec odchytený v první třetině července byl infikován fytoplazmou stolburu, jeden jedinec byl infikován fytoplazmou žloutenky aster a dva jedinci nebyli infikováni fytoplazmou (graf č. 8).

Graf č. 7: Celkový počet odchytených jedinců *Anaceratagallia ribauti* v Březí v roce 2010.



Graf č. 8: Počet infikovaných jedinců v Březí v roce 2010.



Vzhledem k nízkému počtu odchytených jedinců v Lednici v letech 2010, 2011 a 2012, nemůže být hodnocena populační dynamika. V roce 2010 byli v Lednici chyceni 2 jedinci, v třetí třetině července byla odchycena jedna samice a v druhé třetině srpna jedna samice. Samice odchycena v třetí třetině července nebyla infikována fytoplazmou, ale samice odchycená v druhé třetině srpna byla infikována fytoplazmou stolburu. V roce 2011 byli v Lednici odchytení 2 jedinci, v třetí třetině června byla odchycena jedna samice a v první třetině července také

jedna samice. Samice odchycená v třetí třetině června byla infikována fytoplazmou stolburu, ale samice odchycená v první třetině července nebyla infikována fytoplazmou. V roce 2012 v Lednici v první třetině července byla odchycena jedna samice a nebyla infikována fytoplazmou.

6 Diskuze

V této bakalářské práci byly identifikovány fytoplazmy vyskytující se v hmyzím vektoru *Anaceratagallia ribauti* pomocí nested PCR a RFLP analýzy. DNA byla amplifikována pomocí dvou kombinací primerů P1/P7 a R16F2/R16R2. Úspěšnost detekce a identifikace fytoplazmy byla uspokojivá a lze tedy potvrdit, že metoda nested PCR v kombinaci s primery P1/P7 a R16F2/R16R2 je pro toto využití vhodná.

Výhodou nested PCR je její vysoká citlivost, specifická a rychlá detekce fytoplazem. Avšak i tato metoda má několik nevýhod, jakými jsou např. nespecifická amplifikace - falešně pozitivní či falešně negativní výsledky. Z těchto důvodů je nutné vzorky dále analyzovat pomocí RFLP analýzy nebo sekvenováním (Fránová *et al.*, 2007).

Při RFLP analýze byly používány dvě restrikční endonukleázy *RsaI* a *MseI*. Pomocí těchto dvou restrikčních endonukleáz bylo možné detekovat fytoplazmy stolburu a žloutenky aster, avšak v řadě případů byla potvrzena nespecifická amplifikace. Riedle-Bauer *et al.* (2006) potvrdili, že *Anaceratagallia ribauti* je přirozeným vektorem fytoplazmy stolburu. O přenosu dalších fytoplazem není v literatuře uvedena žádná informace. Pomocí RFLP analýzy bylo odhaleno, že se v jedincích vyskytovaly fytoplazmy stolburu a žloutenky aster.

Byla získána jedinečná data, která nebyla dosud publikována. Celkem bylo odchyceno 147 hmyzích jedinců, analyzováno bylo celkem 139 hmyzích jedinců. Pomocí nested PCR bylo zjištěno, že 40,29 % (56 ze 139) jedinců bylo infikováno fytoplazmou: 21 samců, 33 samic a 2 larvy. Celkem 59,71 % (83 ze 139) jedinců nebylo infikováno fytoplazmou: 37 samců, 43 samic a 3 larvy. Fytoplazma stolburu byla identifikována celkem u 21 jedinců, fytoplazma žloutenky aster u 4 jedinců a nespecifické produkty byly zjištěny u 31 vzorků. Jedná se o první případ detekce fytoplazmy žloutenky aster v druhu *Anaceratagallia ribauti*.

Rovněž nebyly nalezeny recentní informace o populační dynamice studovaného druhu. Nejvíce jedinců (15 %; 22 ze 143) bylo odchyceno v Perné a to v první třetině července v roce 2012. Nejvíce hmyzích jedinců *Anaceratagallia ribauti* infikovaných fytoplazmou se rovněž vyskytovalo v první třetině července.

7 Závěr

V rámci bakalářské práce byla vypracována literární rešerše podle dostupné literatury na téma „Molekulární identifikace fytoplazmy stolburu v hmyzím vektoru: *Anaceratagallia ribauti*“.

V experimentální části byly detekovány fytoplazmy v hmyzím vektoru za pomoci nested PCR s použitím primerů P1/P7 a R16F2/R16R2. Bylo potvrzeno, že tato metoda je citlivá a zároveň dostupná pro detekci fytoplazem.

Ve vzorcích DNA izolovaných z jedinců hmyzího vektoru *Anaceratagallia ribauti* byly detekovány *Candidatus* *Phytoplasma asteris* a *Candidatus* *Phytoplasma solani*.

8 Seznam použitých zkratk

DAS ELISA	double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (deoxyribonucleic acid)
kb	kilobáze (kilobase)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rDNA	ribosomální deoxyribonukleotidová kyselina (ribosomal deoxyribonucleic acid)
RE	restrikční enzym (restriction enzyme)
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

9 Seznam použité literatury

Atanasova, Biljana, Dusan Spasov and Dragica Spasova (2010): Qualitative and quantitative analysis of cicadas (Homoptera: *Auchenorrhyncha*) at grapevine in region of Kavadarci, Republic of Macedonia. 20th Anniversary International Scientific Conference, 3th - 4th June 2010, Stara Zagora, BULGARIA, pp. 109-114.

Battle A., Martinez M. A. and Laviña A. (2000): Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 106: 811-816.

Beanland L., Hoy C. W., Miller S. A. and Nault L. R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: *Cicadellidae*). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93(2): 271-276.

Bertaccini A., Fránová J., Paltrinieri S., Martini M., Navrátil M., Lugaresi C., Nebesárová J. and Simková M. (1999): Leek proliferation: A new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology* 105: 487-493.

Bertaccini A. and Duduk B. (2009): Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* 48: 355-378.

Bressan, A., Girolami, V. and Boudon Padieu E., (2005): Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia experimentalis et applicata* 115(2): 283-290.

Carraro L., Ferrini F., Martini M., Ermacora P. and Loi N. (2008): A serious epidemic of stolbur on celery. *Journal of Plant Pathology* 90(1): 131-135.

Christensen N. M., Axelsen K. B., Nicolaisen M. and Schulz A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10(11): 526-535.

Credi R., Terlizzi F., Milanese L., Bondavalli R., Cavallini G., Montermini A. and Dradi D. (2006): Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesses obsoletus*, at sites of grapevine Bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, pp. 182-183.

Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O. and Toševski I. (2014): Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of Bois noir. *Plant pathology* 63: 42-53.

Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Krnjajić S. and Toševski I. (2011): Potential new hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. *Bulletin of Insectology* 64: S129- S130.

Delić D., Seljak G., Martini M., Ermacora, P., Carraro L., Myrta A. and Durić, G. (2007): Surveys for grapevine yellows phytoplasmas in Bosnia and Herzegovina. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 369.

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

Dér Z., Koczor S., Zsolnai B., Ember I., Kolber, M., Bertaccini A., and Alma A. (2007): *Scaphoideus titanus* identified in Hungary. *Bulletin of Insectology* 60(2): 199.

Doi Y., Teranaka M., Yora K. and Asuyama (1967): Mycoplasma or PTLgroup like microorganisms found in phloem elements of plan infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.

Drobnjaković T., Perić P., Marčić D., Picciau L., Alma A., Mitrović J., Duduk B. and Bertaccini A. (2011): Leafhoppers and cixiids in phytoplasma-infected carrot fields: Species composition and potential phytoplasma vectors. *Pestic. Phytomed* 25(4):311-318.

Duduk B., Perić P., Marčić D., Drobnjaković T., Picciau L., Alma A. and Bertaccini A. (2008): Phytoplasmas in carrots: Disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology* 61:327-331.

Elliot S. L., Adler F. R. and Sabelis M. W. (2003): How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology* 84(10): 2568-2574.

Fialová R., Válová P., Balakishiyeva G., Danet J.-L., Šafárová D., Foissac X. and 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.

Fránová J., Petrzik K., Paprštein F., Kučerová J., Navrátil M., Válová P., Nebesářová J., Jakešová H., (2007): Experiences with phytoplasma detection and identification by different methods. *Bulletin of Insectology* 60: 247-248.

Frost K. E., Willis D. K. and Groves R. L. (2011): Detection and variability of aster yellow phytoplasma titer in its insect vectors, *Macrostelus quadrilineatus* (Hemiptera: *Cicadellidae*). *Journal of Economic Entomology* 104: 1800-1815.

Garnier M., Foissac X., Gaurivaud P., Laigret F., Renaudin J., Sailard C. And Bové J. M. (2001): Mycoplasmas, plant, insect vectors and matrimonial triangle. *Life Sciences* 324: 923-928.

Gatineau F., Larrue J., Clair D., Lorton F., Richard-Molard M. and Boudon-Padieu E. (2001): A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: *Cixiidae*). *European Journal of Plant Pathology* 107(3): 263-271.

Gundersen D. E., Lee I.-M. (1996): Ultrasensitive detection by nested-PCR assai using two universal primer pairs. *Phytophatologia Mediterranea* 35, 144-151.

Hanboonsong Y., Choosai C., Panyim S. and Damak S. (2002): Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasmas in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumira). *Insect Molecular Biology* 11: 97-103.

Hoy C. W., Zhou X., Nault L. R., Miller S. A. and Styer J. (1999): Host Plant, phytoplasma, and reproductive status effects on flight behaviour of aster leafhopper (Homoptera: *Cicadellidae*). *Entomological Society of America*, pp. 523-528

Kawakita H., Saiki T., Wei W., Mitsuhashi W., Watanabe K. and Sato M. (2000): Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and egg of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytophatology* 90: 909-914.

Kruger K., De Klerk A., Douglas-Smit N., Joubert J., Pietersen G. and Stiller M. (2011): Aster yellows phytoplasma in grapevines: identification of vectors in South Africa. *Bulletin of Insectology* 64: S137-S138.

Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bottner K. D., Marccone C. and Seemüller, E. (2004): '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4): 1037-1048.

Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E. and Bertaccini A. (1998): Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88.12: 1359-1366.

Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E. and Bartoszyk I. M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S RNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1159-1169.

Lee I.-M., Martini M., Bottner K. D., Dane R. A., Black M. C. and Troxclair N. (2003): Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas

involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93: 894-901.

Lee, I. M., Hammond R. W., Davis R. E. and Gundersen D. E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83(8), 834-842.

Navrátil M., Fialová R., Červená G, Fránová J., Krška B., Mašková V., Mikulová H., Nečas T., Petrusová J., Polák J., Růžička T., Salava J., Svoboda J., Šafářová D., Válová P. and Zeman P. (2008): *Fytoplazmy – Významné patogeny rostlin*. ISBN 80-903545-2-1, 6, Univerzita Palackého v Olomouci ve spolupráci s Českou fytoplatologickou společností

Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Lauterer, P., Šafářová, D. and Starý, M. (2009): The incidence of stolbur disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). *Crop protection*, 28(10), 898-904.

Nickel H. (2003): *The leafhoppers and planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous Insects*. Copublished by Pensoft Publishers, Sofia-Moscow (ISBN 954-642-169-3) and Goecke & Evers, Keltern (ISBN 3-931374-09-2).

Palermo S., Elekes M., Botti S., Ember I., Alma A., Orosz A., Bertaccini A. and Kölber M. (2004): Presence of stolbur phytoplasma in cixiidae in hungarian vineyards. *Vitis* 43: 201-203.

Quaglino F., Zhao Y., Casati, P., Bulgari D., Bianco P. A., Wei W., & Davis R. E. (2013): '*Candidatus Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur- and Bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 8), 2879-2894.

Riedle-Bauer M., Sára A. and Regner F. (2008): Transmission of a stolbur phytoplasma by the agallinae leafhopper *Anaceratgalli ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Phytopathology* 156: 687-690.

Riedle-Bauer M., Tiefenbrunner W., Otreba J., Hanak K., Schildberger B. and Regner F. (2006): Epidemiological observations on Bois noir in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 56(2006), 166-170.

Schneider B. Seemüller E., Smart C. D., Kirkpatrick B. C. (1995) Phylogenic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas In: Razin S., Tully J. G. (eds.): *Molecular and Diagnostics Procedures in Mycoplasmaology*, New York, Academic Press, pp. 369-380.

Shitaka E., Wen-Sheng T. and Matsumoto T. (1969): Mycoplasma or PLT like microorganisms detected in leaves of sugarcane plants infected with white-leaf disease and the suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline Group. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, pp. 79-90.

Szendrei Z. (2012): The impact of plant association on *Macrosteles quadrilineatus* management in carrots. Entomologia Experimentalis et Applicata 143: 191 -198

Webb D. R., Bonfiglioli R. G., Carraro L., Osler R. and Symons R. H. (1999): Oligonucleotides as hybridisation probes to localise phytoplasmas in host plant and insect vectors. Phytopathology 89: 894-901.

Wei W., Davis R. E., Lee I.-M. and Zhao Y. (2007): Computer-stimulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: Identification of ten new phytoplasma groups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:1855-1867.

Westdal, P. H., Barrett C. F. and Richardson H. P. (1960): The six-spotted leafhopper, *Macrosteles fascifrons* (Stål.) and aster yellows in Manitoba. Canadian Journal of Plant Science 41(2): 320-331.

Wilson M. R. and Weintraub P. G. (2007): An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. Bulletin of Insectology 60: 177-178.