

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA, ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**OBOR ZEMĚDĚLSKÉ BIOTECHNOLOGIE**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE  
FYTOPLAZMY STOLBURU INFIKUJÍCÍ JETEL  
LUČNÍ V ČESKÉ REPUBLICE**

**PAVLA KOLOUŠKOVÁ**

Vedoucí diplomové práce:  
Školitel:

Dr. Ing. Jana Fránová  
Dr. Ing. Jana Fránová

2008

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum

Podpis studenta

*V první řadě chci poděkovat Dr. Ing. Janě Fránové za kvalitní odborné vedení, cenné rady a čas věnovaný mé práci a osobě. Poděkování patří též celému kolektivu laboratoře oddělení rostlinné virologie. V neposlední řadě chci vzdát dík mým rodičům za trpělivost a tichou, ale významnou podporu v průběhu mého dosavadního studia.*

## **obsah**

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod                                 | 7  |
| 2. Literární přehled                    | 9  |
| 2.1. Fylogenetické postavení            | 9  |
| 2.2. Morfologie                         | 10 |
| 2.3. Molekulární charakteristiky        | 10 |
| 2.4. Fyziologie a biochemie             | 12 |
| 2.5. Přenos a šíření                    | 13 |
| 2.6. Příznaky                           | 14 |
| 3. Materiál a metody                    | 15 |
| 3.1. Izolace DNA                        | 15 |
| 3.2. Měření koncentrace izolované DNA   | 16 |
| 3.3. PCR                                | 17 |
| 3.3.1. PCR – 16S rDNA                   | 17 |
| 3.3.2. PCR – elongační faktor - Tuf gen | 18 |
| 3.3.3. PCR – gen pro DNA helikázu       | 19 |
| 3.4. RFLP                               | 20 |
| 3.5. Sekvencování                       | 21 |
| 3.6. Příprava reagensů                  | 22 |
| 4. Výsledky a diskuze                   | 24 |
| 5. Závěr                                | 29 |
| 6. Seznam použité literatury            | 31 |
| 7. Přílohy                              | 37 |
| 7.1. 16S rDNA ... obr.: A1-A3, B1-B10   | 38 |

|   |    |
|---|----|
| 7.2. Elongační faktor - Tuf gen ... obr.: 1, A1-A3, B1-B3 | 44 |
| 7.3. Gen pro DNA helikázu ... obr.: 1-3                   | 47 |
| 7.4. Sekvencování ... obr.: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b        | 49 |
| 7.5. Fylogenetický strom ... obr.: 1-3                    | 52 |
| 7.6. Symptomy ... obr.: 1, 2                              | 55 |
| 7.7. Abstrakt   | 56 |

# 1. Úvod

Fytoplazmy jsou patogenní mikroorganismy rostlin. Infikují více než 700 rostlinných druhů. Z rostliny na rostlinu jsou přenášeny hmyzem sajícím mízu nebo vegetativním rozmnožováním rostlin. V rostlinách se vyskytují ve vodivých pletivech, resp. ve šťávě sítkovic, v cytoplasmě infikovaných floemových popř. přilehlých parenchymatických buněk. Systematicky jsou řazeny do skupiny *Mollicutes*, která reprezentuje nejmenší samostatně se replikující formy života na Zemi. Množí se pouze v hypotonickém prostředí. Jsou charakteristické absencí buněčné stěny, pleiomorfním tvarem částic a pozoruhodně malým genomem, cca 680 – 1600 kpb, bohatým na báze AT (Razin a kol., 1998; Bertaccini, 2007; Kúdela a kol., 2002; Lee a kol., 2000; Hoshi a kol., 2007).

Fytoplazmová onemocnění byla dříve považována za virové infekce. Přelom nastal v roce 1967, kdy japonští vědci (Doi a kol., 1967), identifikovali nové, floém kolonizující mikroorganismy, morfologicky podobné mykoplazmám a nazvali je mykoplazmám podobné organismy (mycoplasma-like organisms MLO). V roce 1994 došlo na základě rozhodnutí ICSB (International Congress of Systematic Bacteriology) k oficiálnímu přejmenování mycoplasma-like organism (MLO) na *Phytoplasma* (fytoplazmy). Rozhodnutí bylo učiněno na základě sekvencování 16S rRNA genu a zjištění, že MLO tvoří oddělenou monofyletickou skupinu v rámci *Mollicutes*. Jeden z mnoha případů záměny fytoplazmy za virus je případ z roku 1926, kdy L. O. Kunkel popsal žloutenku astry, ale za jejího původce byly považovány viry (Doi a kol., 1967; Kúdela a kol., 2002).

Fytoplazmy nejsou kultivovatelné *in vitro* a v důsledku této vlastnosti byla ještě donedávna problematická jejich identifikace a klasifikace. S pokrokem metod molekulární biologie nastal v posledních dvou dekadách (hlavně mezi lety 1989-1991) obrat v identifikaci a klasifikaci. Díky sekvenaci 16S rDNA bylo prokázáno, že fytoplazmy tvoří širokou monofyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes*. (Lim a Sears, 1989; Kuske a Kirkpatrick, 1992; Sears a Kirkpatrick, 1994).

Cílem předkládané práce je molekulární charakterizace různých izolátů fytoplazmy stolburu (skupina 16S rDNA XII-A) infikující šlechtitelský materiál jetele lučního v České republice. Dále teoretické a praktické zvládnutí použitých metod

molekulární biologie (PCR, RFLP, sekvencování) a porovnání získané sekvence českých izolátů s daty v GenBank.

Práce vznikla za finanční podpory grantu GA AVČR č. 1QS500510558– Studium výskytu fytopatogenů a jejich genetických variant a grantu MZE ČR-NAZV č. QH71145 – Diagnostika virů a fytoplazem ve šlechtitelském materiálu jetele lučního.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Fylogenetické postavení

Fylogenetické studie prokázaly, že nejbližším předkem fytoplazem je *Acholeplasma laidlawii* z třídy *Anaeroplasmata*, která stejně jako fytoplazmy kóduje aminokyselinu tryptofan kodonem UGG, na rozdíl od ostatních prokaryot, včetně mykoplazem a spiroplazem, které kódují tryptofan kodonem UGA (Bertaccini 2007).

Systematicky patří fytoplazmy do oddělení *Tenericutes* (bakterie bez buněčné stěny), třídy *Mollicutes* a rodu *Phytoplasma*.

Podle fylogenetické příbuznosti, založené na základě RFLP analýzy 16S rDNA, jsou fytoplazmy v současnosti rozděleny do 14 skupin a cca 40 podskupin (Lee a kol., 1998). Na základě počítačové analýzy profilů RFLP bylo nedávno identifikováno celkem 28 skupin (Wei a kol., 2007).

Stolbur byl dříve součástí skupiny žloutenky astry (aster yellows) (16SrI-G), po nastalých změnách v klasifikaci skupin zaujal samostatnou skupinu stolbur (16SrXII) (Lee a kol., 1998).

Skupina stolburu je rozdělena do dvou podskupin A a B. Skupina A byla standardizována metodou PCR/RFLP (16S rDNA) na základě vlastností choroby *Serbian stolbur from pepper*, skupina B podle *Australian grapevine yellows* (Davis a kol., 1996; Lee a kol., 1993, 1998).

Pro Evropu mají význam tyto skupiny: aster yellows group (skupina žloutenky astry); apple proliferation group (skupiny proliferace jabloně); X-disease group (skupina X-choroby); elm yellows group (skupina žloutenky jilmu); stolbur group (skupina stolburu) (Kůdela a kol. 2002). Fytoplazma stolburu bramboru je jedním z karanténních mikroorganismů, na které se vztahuje ohlašovací povinnost daná ze Zákona o rostlinolékařské péči a prováděcích předpisech č. 147/1996 Sb..

Protože fytoplazmy nejsou kultivovatelné *in vitro*, a není tedy podle axenických podmínek možnost zařadit je do rodů, bylo nutno zavést adoptivní systematický subtaxon skupin, a to *Candidatus Phytoplasma* založený na jiných kritériích (IRPCM 2004). Systém je následující: fylogenetická skupina – rod *Candidatus Phytoplasma* (zastoupený referenční fytoplazmou, resp. její sekvencí 16S rRNA) – druh (fytoplazmy příbuzné referenční fytoplazmě – konkrétní choroby) (Stackebrandt a Goebel 1994).



Nový druh *Candidatus* Phytoplasma může být ustanoven, pokud je shodnost v sekvencích 16S rRNA mezi touto a již popsányými *Candidatus* menší než 97,5%. Některé fytoplazmy vykazující podobnost vyšší než 97,5%, které by mohly být zařazeny již do existujícího *Candidatus*, odporují zařazení v důsledku toho, že tvoří ekologicky oddělenou populaci a proto musí tvořit samostatný taxon. Pro případ, kdy je nutné od sebe odlišit dvě fytoplazmy, které jsou zdánlivě příbuzné, platí následující pravidla: tyto fytoplazmy jsou přenášeny jinými vektory, mají odlišné hostitele (vykazují odlišné chování v rostlině), vykazují diverzitu v chromozomální DNA – shodnost méně než 70% (ale 16S rRNA vyrovnaná) (IRPCM 2004).

## 2.2. Morfologie

Fytoplazmy jsou charakteristické absencí buněčné stěny, kterou alespoň částečně nahrazuje trojvrstevná, 7-10nm silná proteino-lipidická membrána. Tvar částic je pleiomorfní, většinou jsou kulovité až oválné, ale vyskytují se i ve vláknitých a větvených formách a to převážně v časných stádiích infekce. Velikost částic se pohybuje mezi 200-800 nm (Razin a kol., 1998; Bertaccini, 2007; Waters a Osbourne 1978; Haggis a Sinha 1978; Lee a Davis 1983).

## 2.3. Molekulární charakteristiky

Fytoplazmy skupiny stolburu vykazují širokou variabilitu ve velikosti genomu v rozmezí 860 až 1350 kpb (Marcone a kol., 1999).

Tak jako ostatní zástupci *Mollicutes* mají i fytoplazmy kruhovou dvouvláknovou molekulu DNA. U všech zástupců ze skupin stolburu (16rXII), žloutenky astry (16SrI), a některých zástupců X-choroby (16SrIII) a proliferace jetele (16SrVI) byla zjištěna přítomnost extrachromozomální DNA, tedy plazmidu (Lee a kol 2000).

V průměru se velikost genomu fytoplazem pohybuje od 680 do 1600 kpb.

Fytoplazmy jsou od mykoplazem infikujících člověka a zvířata geneticky odlišitelné díky přítomnosti mezerníku (tj. mezigenové oblasti - spacer region) (cca 300pb) lokalizovaným mezi 16S a 23S ribosomální oblastí, která kóduje isoleucin tRNA (tRNA<sup>Ile</sup>) (u mykoplazem tRNA<sup>Ile</sup> chybí) a část sekvence pro alanin tRNA (tRNA<sup>Ala</sup>). Sekvencování kompletního genomu dvou fytoplazem ukázala, že sekvence

pro tRNA kodující valin a asparagin je umístěna směrem od 5S rRNA ke 3' konci. Tato skutečnost je unikátním a určujícím znakem fytoplazem využívaným v diagnostice (Ho a kol., 2001).

V současnosti je klasifikace fytoplazem založena na sekvenční a RFLP analýze 16S rRNA genu (Lim a Sears, 1989; Kuske a Kirkpatrick, 1992; Namba a kol., 1993, Gundersen a kol., 1994; Seemuller a kol., 1994., Schneider a kol., 1995).

Tento gen je přítomen u všech prokaryot a jeho konzervativní a variabilní oblasti jsou využitelné k fylogenetické analýze a klasifikaci.

Ostatní geny nebo oblasti DNA fytoplazem, které jsou využitelné ke klasifikaci jsou ribozomální proteiny (rp) *rpl22 a rps3* (Lim a Sears, 1992; Gundersen a kol., 1994; Toth a kol., 1994), 23S a 5S rRNA geny, mezigenová oblast (spacer region) 16S/23S rRNA, Tuf gen, gen pro DNA helikázu (G35p/m) a další (Davis a kol., 1992; Schneider a kol., 1997).

Geny 16S/23S spacer region a ribozomálních proteinů jsou považovány za variabilnější než 16S rRNA geny, ale fylogenetická analýza 16S rRNA, 16S/23S mezigenové oblasti a ribozomálních proteinů ukázala, že vykazují podobnost ve výsledcích v klasifikaci, a to ve vztahu jedné fytoplazmy k druhé a k jiným zástupcům z *Mollicutes* (geny 16S, 23S a 5S rRNA jsou v rámci skupiny identické z 99,8-99,9%) (Lim a Sears, 1989, 1992; Kuske a Kirkpatrick, 1992; Namba a kol., 1993; Gundersen a kol., 1994; Seemuller a kol., 1994; Toth a kol., 1994; Lee a kol., 2000).

Klasifikačním ukazatelem, který umožňuje bližší stanovení příbuznosti mezi fytoplazmami, je analýza Tuf genu. Tuf gen je konzervativní sekvence kódující elongační faktor Tu (EF-Tu), který má zásadní funkci v translačním procesu (podobnost Tuf genu v rámci jedné skupiny je 96-99%, mezi skupinami více než 90%) (Filer a Furano, 1980; Ludwig a kol., 1993; Lee a kol., 2000). Porovnáním fylogenetických výstupů Tuf genu a 16S rDNA bylo prokázáno, že se téměř shodují (Ludwig a kol., 1993). V práci B. Shneidera a kol. (1997) byly navrženy speciální primery TufAY pro skupiny stolbur a žloutenky astry (Aster yellows 16SrI) (homologie v sekvencích těchto skupin se pohybuje mezi 87,8-97,0 %). Primery Tufu byly navrženy pro klasifikaci v rámci skupin žloutenky astry, stolburu a X-choroby (X-disease 16SrIII) (Schneider a kol., 1997). Za použití primerů TufAY a následným restričním štěpením enzymem *HpaII* můžeme skupinu stolburu blíže rozdělit na skupiny VK I, VK II (nebo Tuf type I-II). Tato klasifikace byla ustanovena na základě výzkumu onemocnění vinné révy 'Vergilbungskrankheit' (VK) – onemocnění Bos noir (spadající pod skupinu stolburu).

Toto rozdělení na VK typy má sloužit jako ukazatel geografického rozšíření odlišných fytoplazem této skupiny na různých hostitelích, resp. poukazovat na epidemiologii dané skupiny (Langer a Maixner, 2004).

Primery pro DNA helikázu G35 p/m byly odvozeny od DNA sondy G35I, navržené pro *Italian periwinkle virescence phytoplasma* (skupina žloutenky astry) (Davis a kol., 1992). Analýza založená na použití tohoto specifického páru primerů, není v současnosti tak často využívána, ale pro skupinu stolburu odštěpenou v minulosti od skupiny žloutenky astry může být vhodným fylogenetickým nástrojem.

Zdánlivě rozsáhlý genom některých fytoplazem je výsledkem častého výskytu repetice ve fytoplazmovém genomu (Bai a kol., 2006). Repetice jsou organizovány v rozsáhlých seskupeních a mohou fungovat jako potenciální mobilní jednotky (PMUs), které obsahují transpozázy, insertní sekvence a specializované geny pro faktory  $\sigma$ . PMUs jsou zodpovědné za genetickou variabilitu. Dynamický genom fytoplazem, zapříčiněný PMUs, jim umožňuje osidlovat stále širší spektrum rostlinných hostitelů a hmyzích vektorů, stejně jako zapříčiňuje zmíněnou heterogenitu v genomech blízké příbuzných fytoplazem (Bai a kol., 2006; Jomantiene a Davis, 2006).

## 2.4. Fyziologie a biochemie

Fytoplazmy ve svém chromozomu postrádají v důsledku reduktivní evoluce mnoho genů spojených s biosyntézou mastných kyselin, aminokyselin, postrádají Krebsův cyklus, cyklus oxidativní fosforylace a pentósový cyklus. Postrádají též geny pro fosfotransferázový systém a chybí též mechanismus pro metabolizaci UDP-glukosy (prekursor glykogeneze) na glukosa-1-fosfát. Mechanismy metabolizace a transportu nukleotidů nejsou zcela zřejmé.

Absence těchto významných metabolických drah ukazuje na to, že fytoplazmy disponují unikátními mechanismy příjmu látek, zvláště sacharidů, ale i nukleotidů z hostitelského prostředí a jejich metabolizace ve speciálních metabolických drahách.

Fytoplazmy osidlují rostlinné tkáně bohaté na živiny, proto se u nich v průběhu evoluce eliminovaly výše zmíněné syntetické dráhy, jejichž asimilační schopnosti kompenzuje bohatý příjem živin z prostředí hostitelské buňky.

Vysoká spotřeba látek z hostitelského prostředí způsobuje i hormonální nerovnováhu v hostitelské buňce a tento jev zřejmě zapříčiňuje symptomy onemocnění.

Významnou metabolickou drahou, kterou fytoplazmy disponují, je biosyntéza folátu (kyselina listová), která zřejmě fytoplazmám umožňuje osidlovat široké a rozdílné spektrum hostitelských rostlin a hmyzích vektorů.

Analýza genomu fytoplazem identifikovala geny pro enzymy podobné glukanáze a hemolyzinu, které jsou zřejmě faktory virulence (Oshima a kol., 2004).

Fytoplazmy jsou citlivé na antibiotika tetracyklinové řady, která poškozují jejich ribozómy, antibiotika penicilinové řady na ně účinek nemají (Ishii a kol., 1967).

## 2.5. Přenos a šíření

Zvláštní význam v přenosu fytoplazem mají hmyzí vektory, protože jsou patrně jediným místem přežívání mimo hostitelskou rostlinu. Podílejí se též na přenosu fytoplazem z jedné rostliny na druhou.

Fytoplazmy se po příjmu potravy dostávají do střeva hmyzu, kde se množí, odtud se přes stěnu střeva dostávají do hemolymfy, kde cirkulují. Poté vstupují do slinných žláz, kde se dále množí, a odkud se dostávají při příjmu potravy na další rostliny (Kúdela a kol., 2002). Bylo též prokázáno, že fytoplazmy jsou schopny přenosu hmyzími vajíčky (Alma kol., 1997).

Fytoplazmy mohou být též šířeny vegetativním množením pomocí řízků a roubů, oddenky, cibulemi a hlízami (Lee a Davis, 1992).

Hmyzí vektory fytoplazem zahrnují zástupci z řádu stejnokřídlých (Homoptera), který zahrnuje čeledi křískovitých (*Cicadellidae*), žilnatkovitých (*Cixiidae*), mérovitých (*Psillidae*) a řád ploštic (Heteroptera), zastoupený čeledí klopuškovitých (*Miridae*) (Bantari a Zeyen, 1979; Brčák, 1979; Grylls, 1979; Nielson, 1979; Tsai, 1979).

Známými vektory fytoplazem skupiny stolburu jsou zástupci z čeledi žilnatkovitých (*Cixiidae*), a to *Hyalesthes obsoletus* (popsal Signoret 1867), vektor Bos noir a VK (Maixner a kol., 1995; Sforza a kol., 1998), *Pentastiridius beileri* (popsal Wagner 1970), který přenáší stolbur na cukrovou řepu (Gatineau a kol., 2001). Jako další přenašeči se uvádějí například křísci *Aphrodes bicinctus*, *Euscelis plebeja*, *Macrosteles quadripunctualis* a klopušky *Lygus pratensis*, *L. rugulipennis*, *L. gemellatus* (Růžička 2008).

Geograficky je fytoplazma stolburu rozšířena v Evropě (Albánie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Česká republika, Francie, Chorvatsko, Itálie, Maďarsko,

Německo, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko, Řecko, Slovensko, Slovinsko, Srbsko, Španělsko, Švýcarsko, Ukrajina), a v Asii (Arménie, Ázerbajdžán, Turecko, Izrael, Kyrgyzstán, Libanon, Saudská Arábie, Tádžikistán, Uzbekistán) (Růžička 2008).

## 2.6. Příznaky

Rostliny infikované fytoplazmami vykazují široké spektrum příznaků, jako je virescence (zelenokvětost), fylodie (přeměna květů v listům podobné útvary), květní sterilita, proliferace (metlovitost), prodlužování internodií a zakrslost (Bertaccini 2007).

Přítomnost fytoplazem patřících do skupiny stolburu byla prokázána u mnoha bylinných hostitelů zahrnující významné plodiny, např. brambory, tabák, rajče, pepř, jahodník (Fos a kol., 1992; Marccone and Ragazzino, 1995; Viczian a kol., 1998; Favali a kol., 2000) a vybrané druhy z čeledi *Poaceae* (Marccone a kol., 1997; Battle a kol., 2000), stejně tak i u vinné révy (Maixner a kol., 1995; Seruga a kol., 2003), broskvoně a třešně (Paltrinieri a kol., 2001), jabloně (Bertaccini a kol., 2001), švestky (Paltrinieri a kol., 2004), olivovníku a avokáda (Marzachi a kol., 2000; Lavina a kol., 2002).

Fytoplazma stolburu vytváří různé příznaky na různých rostlinách. U bramboru například zelenokvětost a malformace květních částí, předčasné vadnutí a žloutnutí listů, zkracování internodií, zakrsávání, zbytnění stonku, antokyanové zbarvení, silné zmnožení růstu z hlíz a tvorba vzdušných hlízek, hlízy jsou malé a měkké. Na rajčeti vykazuje podobné symptomy jako u bramboru, navíc i metlovitost a chlorotické zbarvení, žloutnutí a další. Na paprice například keříkovitost (Růžička 2008). Na výše uvedených příkladech se dají obecně sumarizovat příznaky fytoplazmy stolburu.

Synonyma pro onemocnění stolburu jsou většinou odvozena od hostitelské rostliny, jsou to: stolbur bramboru (Potato stolbur phytoplasma), onemocnění révy vinné (Grapevine bois noir phytoplasma; VK - grapevine yellows phytoplasma; black wood of grapevine), stolbur rajčete (Stolbur of tomato), stolbur tabáku (Stolbur of tobacco) a další.

### 3. Materiál a metody

Testované vzorky jetele lučního se symptomy zakrslosti byly získány v průběhu podzimu 2004 ze šlechtitelské stanice v Hladkých Životicích. Po izolaci a amplifikaci 16S rDNA a následném restričním štěpení byla identifikována fytoplazma stolburu (16S rDNA XII-A).

Práce je zaměřena na bližší fylogenetické zařazení dané fytoplazmy.

#### 3.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena chloroform-fenolovou metodou s následnou precipitací izopropanolem (Lee a kol., 1991)

- 2 – 3 g čerstvé tkáně bylo homogenizováno v předchlazené třecí misce s tekutým dusíkem
- bylo přidáno 14 ml Grinding pufru
- homogenizovaná tkáň byla filtrována přes sílon a tuhé zbytky v třecí misce spláchnuty 7 ml Grinding pufru a opět filtrovány pře sílon, homogenát byl filtrován do 50ml centrifugačních zkumavek umístěných v ledové tříšti
- filtrát byl centrifugován při 13 000rpm/20min/4°C
- po odstranění supernatantu byly k peletu přidány 4ml extrakčního pufru a 40µl proteinázy K, pelet byl opatrně resuspendován
- bylo přidáno 440µl sarkosylu a dobře promícháno
- směs byla převedena do inkubační nádoby a inkubována 1 – 2 hodiny ve vodní lázni při teplotě 55°C
- směs byla převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována při 8000rpm/15min/4°C
- opatrně byl odebrán supernatant do nové centrifugační zkumavky a přidáno 2,5ml isopropanolu, směs byla opatrně promíchána a na 30min. uložena do mrazáku při teplotě -20°C
- směs byla centrifugována při 8000rpm/15min/4°C

- byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 3ml TE pufru, 75 $\mu$ l SDS a 30 $\mu$ l proteinasy K, směs byla opatrně promíchána, převedena do inkubačních nádobek a inkubována 1 hodinu při teplotě 37°C
- bylo přidáno 525 $\mu$ l NaCl a směs dobře promíchána
- bylo přidáno 420 $\mu$ l CTAB/NaCl a dobře promícháno a inkubováno 10 minut při teplotě 65°C
- byly přidány 4ml chloroform-izoamylalkolu a směs dobře promíchána
- směs byla převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována při 8000rpm/10min/4°C
- opatrně byl odebrán supernatant do nové centrifugační zkumavky a přidáno 2ml fenolu a 2ml chloroformu, směs byla opatrně promíchána do spojení fází
- směs byla centrifugována při 8000rpm/10min/4°C
- opatrně byl odebrán supernatant do nové centrifugační zkumavky a přidáno 2,5ml izopropanolu, směs byla promíchána a na 1 hodinu umístěna v mrazáku při -20°C
- směs byla centrifugována při 11000rpm/20min/4°C
- byl odstraněn supernatant a k peletu byl přidán 1ml ethanolu
- směs byla centrifugována (tak aby se pelet neodtrhl) při 10000rpm/10min/4°C
- byl odstraněn ethanol a pelet se nechal vysušit asi 5minut při 20°C
- vysušený pelet byl resuspendován v 50 $\mu$ l sterilní vody

### **3.2. Měření koncentrace izolované DNA**

K 4 $\mu$ l izolované DNA bylo přidáno 396 $\mu$ l sterilní vody a takto připravená směs byla připravena k měření absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 260nm, z výsledné absorbance byla vypočtena koncentrace a vzorek naředěn na koncentraci 20ng/ $\mu$ l (použitý spektrofotometr: GenQuant spectrofotometer, Amersham Biosciences).

### 3.3. PCR (polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce)

Pro jednu PCR reakci bylo použito 20 ng templátové DNA (Schaff a kol., 1992) za následujících podmínek: počáteční denaturace 94°C – 2 min., 35 amplifikačních cyklů (denaturace 94°C – 1 min., nasedání primerů 50°C – 2 min., syntéza řetězců 72°C – 3 min.), na závěr reakce následuje krok dosyntetizování řetězců při 72°C – 10 min. (u odlišných primerů se teploty liší viz. PCR cykly). Při PCR byly použity následující univerzální primery pro specifickou detekci fytoplazem (použitý cycler: MJ Research thermocycler, Waterstown, MA, USA).

#### schéma provedených PCR:

16S rDNA a) direct P1 / P7

(3.3.1) b) direct P1 / P7 → nested R16F2n / R16R2

elongační faktor – Tuf gen direct fTuf1 / rTuf1 → a) nested fTufAY / rTufAY

(3.3.2) b) nested fTufu / rTufu

gen pro DNA helikázu direct G35 p/m

(3.3.3.)

#### 3.3.1 PCR – 16S rDNA

a) direct: primery: **P1 / P7**

PCR cyklus: 94°C / 2 min. (94°C / 1 min. – 50°C / 2 min. – 72°C / 3 min.)

35x – 72°C / 10 min. (Schaff a kol. 1992)

sekvence primerů: P1: 5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3' (Deng a Hiruki, 1991); 1-25pb

P7: 5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3' (Schneider a kol., 1995); 1813-1831pb (1788pb)



b) nested: primery: **P1 / P7** (viz. a)) → **R16F2n / R16R2**

PCR cyklus: viz. primery P1 / P7

sekvence primerů: R16F2n: 5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3' (Gundersen a kol., 1996); 144-164pb

R16R2: 5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA ACC CCG 3' (Lee a kol., 1993); 1365-1390pb (1201pb)

### 3.3.2. PCR – elongační faktor – Tuf gen

Direct: primery: **fTuf1 / rTuf1**

PCR cyklus: 94°C / 2 min. (94°C / 30 sec. – 53°C / 30 sec. – 72°C / 1 min.)  
35x – 72°C / 5 min. (Schneider a kol., 1997)

sekvence primerů: Tuf1 f - 5' CAC ATT GAC CAC GGT AAA AC 3' (Schneider a kol., 1997); 1100pb

Tuf1 r - 5' CCA CCT TCA CGA ATA GAG AAC 3' (Schneider a kol., 1997); 1100pb

a) nested: primery: **fTufAY / rTufAY**

PCR cyklus: 94°C / 2 min. (94°C / 30 sec. – 53°C / 30 sec. – 72°C / 1 min.)  
35x - 72°C / 5 min. (Schneider a kol., 1997)

sekvence primerů: TufAY f - 5' GCT AAA AGT AGA GCT TAT GA 3'  
(Schneider a kol., 1997); 940pb

TufAY r - 5' CGT TGT CAC CTG GCA TTA CC 3' (Schneider a kol., 1997); 940pb

b) nested: primery: **fTufu / rTufu**

PCR cyklus: 94°C / 2 min. (94°C / 30 sec. – 53°C / 30 sec. – 72°C / 1 min.)  
35x – 72°C / 5 min. (Schneider a kol., 1997)

sekvence primerů: Tufu f - 5' CCT GAA GAA AGA GAA CGT GG 3' (Schneider  
a kol., 1997); 850pb

Tufu r - 5' CGG AAA TAG AAT TGA GGA CG 3' (Schneider  
a kol., 1997); 850pb

### 3.3.3. PCR – gen pro DNA helikázu

Direct: primery: **G35 p/m**

PCR cyklus 94°C / 1 min. (94°C / 2 min. – 50°C / 2 min. – 72°C / 3 min.)  
35x – 72°C / 10 min. (Davis a kol., 1992)

sekvence primerů: G35p: 5' TAA CAC TGT GGA AGC TCA 3' (Davis a kol.,  
1992); 1250pb

G35m: 5' CGT CAA TGG CTA ATC GAT 3'(Davis a kol.,  
1992); 1250pb

#### **PCR: reakční směs pro jeden vzorek**

|                  |         |
|------------------|---------|
| MM (master mix)  | 12,5 µl |
| H <sub>2</sub> O | 10,5 µl |
| primer (f)       | 0,5 µl  |
| primer (r)       | 0,5 µl  |
| vzorek           | 1 µl    |

Tento poměr reagensí byl použit u direct PCR. Jediným rozdílem ve směsi u nested PCR je, že produkt z direct PCR byl naředěn v poměru 1:29 s ultračistou vodou.

Pro elektroforetickou analýzu PCR produktu byl použit 1% agarosový gel. Na 17 vzorků bylo použito 0,35g agarosy a 35ml 1xTBE (na 8 vzorků 0,27g agarosy a

27ml 1xTBE). Směs byla dobře promíchána a přivedena k varu, po pomalém schlazení nalita do elektroforetické vaničky a po vhodné dobu ponechána utuhnout (cca 20 min.).

Do jamek gelu, ponořeného v adekvátním pufru (1xTBE) v elektroforéze, bylo pipetováno 6 $\mu$ l PCR vzorku + 1 $\mu$ l barvy (SYBR green), markeru (100bp) bylo použito 0,8 $\mu$ l a obarveno stejným množstvím barvy jako u vzorku.

Elektroforéza probíhala pod napětím 90V cca 25 minut.

### **3.4. RFLP (analýza polymorfismu délky restričních fragmentů PCR produktů)**

K restričnímu štěpení byla využita řada restričních enzymů, jejich výběr byl závislý na primerech použitých v předešlé PCR.

PCR a k němu vybrané restriční enzymy ukazuje následující schéma.

PCR: **16S rDNA**: direct **P1 / P7** → RFLP: ***TruI***

PCR: **16S rDNA**: nested **P1 / P7** → **R16F2n / R16R2** → RFLP: ***MseI, TaqI, AluI, BfaI, RsaI, HhaI, HaeIII, HpaII, KpnI***

PCR: **elongační faktor – Tuf gen**: direct **fTuf1 / rTuf1...** nested a) **fTufAY / rTufAY**  
→ RFLP: ***HpaII, TruI, BspI***

nested b) **fTufu / rTufu**

→ RFLP: ***TasI, TruI, AluI***

PCR: **gen pro DNA helikázu**: direct **G35 p/m** → RFLP: ***MseI, AluI***

Reakční směs pro restriční štěpení jednoho vzorku tvořilo doporučené množství enzymu (cca 2U) a pufru (dané výrobcem), 1 $\mu$ l PCR produktu a ultračistá voda pro doplnění do 15 $\mu$ l. Reakční směs byla inkubována při teplotě 37°C po dobu 24-48 hodin, výjimku tvoří enzymy *TasI*, *BspI*, *TaqI* a *TruI* které se inkubují při teplotě 65°C.

Pro elektroforetickou analýzu produktů restričního štěpení byl použit 8% akrylamidový gel ve složení: 4,8ml sterilní H<sub>2</sub>O; 670 $\mu$ l 10xTBE; 1,4ml (N,N'-

methylenbisakrylamid, roztok 29:1, AA); 103,3μl amonium fosfátu (APS); 4μl TMD (N, N,N',N'-tetramethylethylendiamin). Směs byla dobře promíchána a rychle převedena do formy na gel. Gel byl ponechán tuhnout max. 10 minut.

Do jamek gelu, ponořeného v adekvátním pufru (1xTBE) v elektroforéze, bylo pipetováno 8μl štěpeného vzorku + 4μl barvy (Blue Orange), markeru (100bp) byly použity 2μl a obarveny stejným množstvím barvy jako u vzorku.

Elektroforéza probíhala pod napětím 140V cca 45 minut.

### 3.5. Sekvencování

Pro sekvencování byl vybrán vzorek, který se po PCR a následné analýze profilu z RFLP jevil jako nejreprezentativnější (v restričních profilech vykazoval shodnost s kontrolami).

Tento vzorek byl amplifikován primery fTuf1/rTuf1, P1/P7, G35p/m a následně přečištěn pomocí kitu (Quiagene)

přečištění probíhalo v následujících krocích:

- k PCR produktu (jeho objem nesměl přesáhnout 50μl) bylo přidáno 130μl pufru P. Směs byla promíchána a přenesena na spin filter.
- směs byla inkubována 1min. při teplotě 20°C
- dále byla směs na spin filtru centrifugována při 10000rpm/30s
- na spin filtr bylo přidáno 700μl promývacího pufru (wash buffer) a opět centrifugováno při 10000rpm/30s
- po odstranění filtrátu byla směs centrifugována při 14000rpm/3min. pro odstranění zbylého ethanolu
- spin filtr byl přenesen do nové zkumavky, tzv. recieve tube, o objemu 1,5ml a do středu spin filtru bylo přidáno 20μl vymývacího pufru (elution buffer)
- směs byla inkubována 3 min. při 20°C a následně centrifugována při 10000rpm/1min
- 2μl filtrátu ze spin filtru byly s 2μl barvy (Sybr green) nanášeny na 1% agarozový gel (0,22 agarozy a 22ml 1x TBE)

Pro sekvencování byly použity stejné primery jak pro amplifikaci. K sekvenci byl použit BIG DYE sequencing kit (PE Biosystems, Warrington, UK). Výsledné

fragmenty DNA byly sekvencovány z obou stran a spojeny v jednu molekulu pomocí software programu Vector NTI suite 8, Contig Express. Tato molekula byla poté srovnána s databází GenBank pomocí programu BLAST (použitý sekvenátor: ABI Prism 310 sequencer – PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 3.6. Příprava reagensí

#### Grinding pufr (250ml)

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| sacharóza                        | 25g    |
| polyvinylpyrrolidon (PVP)        | 5g     |
| hovězí sérový albumin (BSA)      | 0,365g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 4,14g  |
| KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,025g |

Na 100ml pufru bylo přidáno 0,53g kyseliny askorbové a následně bylo nutné upravit pH na 7,6 pomocí roztoku NaOH.

#### Extrakční pufr (300ml)

|   |        |
|---|--------|
| Tris-HCl  | 1,112g |
| EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O) | 3,722g |
| NaCl  | 1,416g |

#### CTAB/NaCl pufr

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| NaCl                              | 4,1g |
| H <sub>2</sub> O                  | 80ml |
| cetyldimethylethylammonium bromid | 10g  |

Do roztoku H<sub>2</sub>O a NaCl bylo za stálého míchání přidáváno CTAB a po jeho rozpuštění byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 100ml a bylo upraveno pH na 8,2.

#### 10x TE pufr

|               |         |
|---------------|---------|
| 0,1M Tris-HCl | 1,211   |
| 0,01M EDTA    | 0,37224 |

Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100ml a pomocí NaOH upraveno pH na 8.

10x TBE pufr

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ ) | 54g   |
| k. boritá                | 27,5g |
| 0,5 M EDTA               | 20 ml |

Pufr byl doplněn na objem 500ml destilovanou vodou a pomocí NaOH bylo upraveno pH na 8,3.

1x TBE pufr

|         |      |
|---------|------|
| 10x TBE | 50ml |
|---------|------|

Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 500ml.

0,5M EDTA

|                  |       |
|------------------|-------|
| EDTA             | 18,6g |
| H <sub>2</sub> O | 100ml |

pH roztoku bylo upraveno pomocí NaOH na 8.

Amonium persulfát (APS)

|     |      |
|-----|------|
| APS | 0,1g |
|-----|------|

0,1g APS bylo rozpuštěno v 1ml H<sub>2</sub>O.

## 4. Výsledky a diskuze

### 16S rDNA, mezigenová oblast 16S/23S rDNA, 23S rDNA

Pro identifikaci a zařazení fytoplazmy do skupiny byly vzorky amplifikovány direct PCR s primery P1/P7 (7.1. obr.: A1) a následně znovu amplifikovány v nested PCR použitím primerů R16F2n/R16R2 (7.1. obr.: B1). Primery P1/P7 amplifikují produkt o velikosti cca 1800pb zahrnující gen pro 16S rRNA, 16S/23S mezigenovou oblast a část genu pro 23S rRNA. Primery R16F2n/R16R2 amplifikují produkt o velikosti cca 1200pb zahrnující část genu pro 16S rRNA. Následně bylo u všech pozitivních vzorků č. 1 – 8 (+ MOL-Molliere disease v štěpeních suploval funkci referenčního profilu) provedeno restriční štěpení enzymy *AluI* (7.1. obr.: B2) a *MseI* (7.1. obr.: B8). Ze získaných elektroforetických profilů byla identifikována skupina fytoplazmy stolburu (16SrXII) podskupina A. Elektroforetické profily byly srovnány s prací R.E. Davise (Davis a kol., 1997), kde vzorek STOL (stolbur) odpovídal našemu profilu, v této práci však ještě stolbur patřil systematicky pod skupinu žloutenky astry (16SrI) podskupina G. Až po revizi klasifikace I. M. Leeem (Lee a kol., 1998) byl stolbur zařazen do vlastní skupiny (16SrXII) rozdělenou na podskupinu A a B. A skupina tedy odpovídá profilu STOL, B skupina odpovídá profilu AUSGY (Australian grapevine yellows) v práci R. E. Davise z roku 1997.

Pro podporu zařazení vzorků do skupiny stolburu (podskupiny A) byly použity další restriční enzymy, a to *TaqI* (7.1. obr.: B10), *BfaI* (7.1. obr.: B3), *RsaI* (7.1. obr.: B9), *HhaI* (7.1. obr.: B5), *HaeIII* (7.1. obr.: B4), *HpaII* (7.1. obr.: B6), *KpnI* (7.1. obr.: B7).

V případě enzymů *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI* a *TaqI* došlo k vytvoření specifických produktů resp. RFLP profilů. U enzymu *AluI* bylo nutno štepit produkt min. 72 hodin (rozdíl od standardních 24 hodin). Při štěpení enzymem *BfaI* nedocházelo ani při dlouhodobé inkubaci (déle než 48 hodin) a zvětšení dávky enzymu k rozštěpení celého produktu a docházelo tak k tvorbě nespecifických proužků. Stejný problém s enzymem *BfaI* popisuje Lee ve své práci z roku 1998 (Lee a kol., 1998) a přisuzuje mu nedokonalé štěpení produktu. Při štěpení enzymem *RsaI* došlo u vzorku 8 k vyštěpení specifických proužků, ale i k nespecifickému pruhování zřejmě způsobeným větší kontaminací vzorkem MOL nebo špatným průběhem elektroforézy.

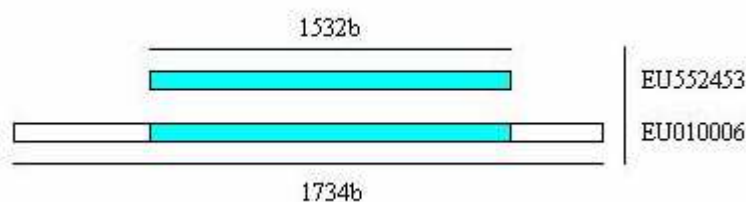
Získané RFLP profily odpovídaly referenčním profilům v dříve publikovaných studiích (Lee a kol., 1998 podle Davis a kol., 1997; Gibb a kol., 1995; Lee a kol., 1993, Marcone a kol., 1997).

Ostatní profily vykazující částečné nebo nespecifické štěpení můžeme považovat za chybné v důsledku nedokonalého štěpení produktu nebo směsné infekce s jinou skupinou fytoplazem či jiných nezjištěných příčin.

Při amplifikaci vzorků v direct PCR s primery P1/P7 (7.1. obr.: A1) vykazovaly pozitivitu vzorky č. 1, 3, 6, 8. Tyto byly štěpeny enzymem *TruI* (7.1. obr.: A2) a elektroforetické profily porovnány s referenčním profilem (Duduk a Bertaccini 2006).

Pro sekvenční analýzu 16S rDNA byl vybrán vzorek č. 6 (6. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 1/38/40 (IV)), který v restričních profilech vykazoval vysokou specifitu. Vzorek byl amplifikován primery P1/P7 a následně sekvencován. Produkt o délce 1532b byl srovnán s daty v GenBank pomocí programu BLAST. Nejpříbuznější fytoplazmou v sekvenci konzervativní 16S rDNA byla srovnáním dat stanovena *Candidatus* *Phytoplasma solani* (accession number: EU010006), bližší popis včetně sekvence 7.4. obr.: 1b a fylogenetický strom 7.5. obr.: 1 (diagnostikovaná fytoplazma vyznačena žlutě). Podobnost v sekvencích této a diagnostikované fytoplazmy vykazovala 100%. Diagnostikovaná fytoplazma získala v GenBank accession number: EU552453 (7.4. obr.: 1a).

Obrázek níže naznačuje podobnost mezi diagnostikovanou a jí nejpříbuznější fytoplazmou. Podobnost je též vyznačena přímo na sekvencích modrou barvou (7.4. obr.: 1a a 1b).



## elongační faktor - Tuf gen

K amplifikaci elongačního faktoru, tedy Tuf genu (EF Tu), byly vzorky nejdříve amplifikovány v direct PCR s primery fTuf1/rTuf1, které tvoří produkt o velikosti



1100pb a následně v nested PCR a) primery fTufAY/rTufAY (940pb); b) fTufu/rTufu (850pb) (7.2. obr.: 1).

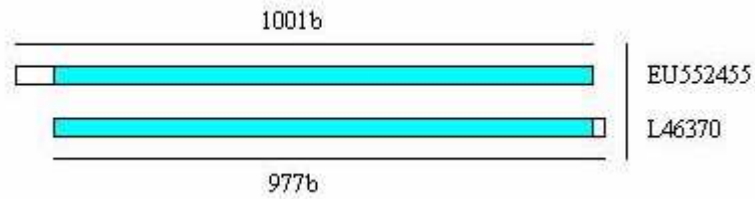
a) pozitivní vzorky č. 1-8 byly po PCR s primery fTufAY/rTufAY štěpeny restrikními enzymy *BspI* (7.2. obr.: A1), *HpaII* (7.2. obr.: A2), *TruI* (7.2. obr.: A3). V případě enzymu *HpaII* byly vyštěpeny specifické proužky korespondující s referenčním profilem (Schneider a kol., 1997), pouze u vzorku 7 se navíc vyštěpily nnespecifické proužky naznačující směsnou infekci pravděpodobně s fytoplazmou skupiny žloutenky astry (16SrI). Použitím enzymů *BspI* a *TruI* byly získány specifické profily u vzorků 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, avšak u vzorku 7 došlo opět k vyštěpení nnespecifických prožků.

Podle štěpení enzymem *HpaII* lze dále rozdělit skupinu stolburu na VKI, nebo VKII (Tuf type I, II) (Langer a Maixner 2004). Srovnáním restrikních profilů bylo určeno zařazení do skupiny VKII. Skupina VKII je obecně nejrozšířenější a naznačuje ekologické a geografické rozšíření fytoplazmy.

b) pozitivní vzorky č. 1-8 byly po PCR s primery fTufu/rTufu štěpeny restrikními enzymy *AluI* (7.2. obr.: B1), *TasI* (7.2. obr.: B2), *TruI* (7.2. obr.: B3). V případě enzymu *AluI* u vzorku 4 byl vyštěpen zcela odlišný profil naznačující infekci fytoplazmou ze skupiny X-choroby (16SrIII), u vzorku 7 byly vyštěpeny specifické proužky, ale i proužky shodné s profilem u vzorku č.4, proto uvažujeme o směsné infekci fytoplazem stolburu a X-choroby. U ostatních vzorků byly vyštěpeny specifické proužky korespondující s referenčním profilem. V případě enzymů *TasI* a *TruI* byly shledány shodné výsledky jako u enzymu *AluI* (referenční profily: Schneider a kol., 1997).

Pro sekvenční analýzu byl vybrán stejný vzorek jako v případě 16S rDNA, a to č. 6. Po amplifikaci vzorku primery fTuf1/rTuf1 a jeho následném sekvencování byl produkt o délce 1001b srovnán s daty v GenBank pomocí programu BLAST. Nejpříbuznější fytoplazmou z pohledu Tuf genu byla určena Non-culturable plant pathogenic bacteria sp. clone STOLF (accession number: L46370), bližší popis včetně sekvence 7.4. obr.: 2b. a fylogenetický strom 7.5. obr.: 2 (diagnostikovaná fytoplazma vyznačena žlutě). Podobnost mezi sekvencemi byla opět 100%. Diagnostikovaná fytoplazma získala v GenBank accession number: EU552455.

Obrázek níže naznačuje podobnost mezi diagnostikovanou a jí nejpříbuznější fytoplazmou. Podobnost je též vyznačena přímo na sekvencích modrou barvou (7.4. obr.: 2a a 2b).

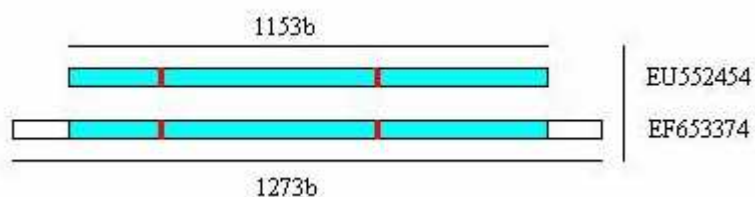


## gen pro DNA helikázu

Vzorky byly amplifikovány primery G35 p/m (7.3. obr.: 1), které amplifikují produkt o velikosti cca 1250pb. Pozitivní vzorky č. 1, 2, 3, 4, 6, 8 byly následně štěpeny enzymy *AluI* a *MseI*. V práci autorů Duduk a Bertaccini (2006) bylo provedeno restriční štěpení enzymem *AluI*. Zde je popsáno specifické štěpení referenčního stolburu a shodnost tohoto profilu s testovanými vzorky, profily ale nebyly publikovány, tudíž není k dispozici referenční profil. Profily budou zřejmě nejvíce odpovídat profilu u vzorku č. 6, který byl následně použit k sekvenční analýze.

Pro sekvencování byl vzorek č. 6 amplifikován primery G35 p/m. Produkt o délce 1153b byl srovnán s daty dostupnými v GenBank pomocí programu BLAST. Jako nejpříbuznější byla určena *Candidatus Phytoplasma solani* isolate 2CH (accession number: EF653374), bližší popis včetně sekvence 7.4. obr.: 3b. a fylogenetický strom 7.5. obr.: 3 (diagnostikovaná fytoplazma vyznačena žlutě). Podobnost mezi sekvencemi byla 99,8%. Diagnostikovaná fytoplazma získala v GenBank accession number: EU552454.

Obrázek níže naznačuje podobnost mezi diagnostikovanou a jí nejpříbuznější fytoplazmou. Podobnost je též vyznačena přímo na sekvencích modrou barvou, červenou barvou jsou vyznačeny odlišnosti. V tomto případě se lišila sekvence v červeně označených částech ve dvou bázích, a to v pozici 465 baze, u diagnostikované (EU552454) byla baze T u nejpříbuznější (EF653374) byla baze C. Dále v pozici 948 baze byla u diagnostikované baze A, u nejpříbuznější baze G (7.4. obr.: 3a a 3b).



Srovnáním sekvencí s daty v GenBank byly získány sekvence nejpříbuznějších fytoplazem, a to v případě 16SrDNA s podobností 100%, u Tuf genu také 100% a v genu pro DNA helikázu 99,8%, avšak tyto příbuzné sekvence byly vždy z jiného izolátu fytoplazmy spadající pod skupinu stolburu. Proto bylo nutné zjistit, zda byly tyto sekvencovány i v ostatních dvou genech, a v případě, že ano, jak se liší. Analýzou dostupných dat (k 15.4. 2008) v GenBank bylo zjištěno, že ani u jednoho z izolátů nebylo provedeno sekvencování ve dvou ostatních genech.

## 5. Závěr

Testované vzorky jetele lučního (*Trifolium pratense*), u kterých byl sledován symptom zakrsloti (ilustrační obrázky 7.6. obr.: 1, 2), byly získány v průběhu podzimu r. 2004 ze šlechtitelské stanice v Hladkých Životcích (Šlechtitelská firma Ing. Hana Jakešová, CSc.).

Následně byla provedena izolace DNA ze vzorků a amplifikace fytoplazmové DNA primery specifickými pro fytoplazmy. Restrikčním štěpením byla identifikována fytoplazma stolburu (16S rDNA XII-A).

Infekce fytoplazmou byla detekována prostřednictvím PCR za použití primerů P1/P7 a následnou nested PCR s primery R16F2n/R16R2. Restrikčním štěpením enzymy *MseI*, *TaqI*, *AluI*, *BfaI*, *RsaI*, *HhaI*, *HaeIII*, *HpaII*, *KpnI* byly získány profily, které odpovídaly dříve publikovaným zástupcům skupiny stolburu (16S rDNA XII-A).

Stejných výsledků bylo dosaženo při použití direct PCR s primery P1/P7 a následným restrikčním štěpením enzymem *TruI* a dle elektroforetického profilu bylo prokázáno, že se jedná skutečně o fytoplazmu stolburu .

Dále byly použity primery fTuf1/rTuf1 v direct PCR a v nested PCR primery a) fTufAY/rTufAY (s následným štěpením restrikčními enzymy *HpaII*, *TruI*, *BspI*); b) fTufu/rTufu (s následným štěpením restrikčními enzymy *TasI*, *TruI*, *AluI*), které potvrdily předchozí zjištění. Podle štěpení enzymem *HpaII* byl identifikován Tuf type II.

Doplňujícím bylo použití primerů G35 p/m následované restrikčním štěpením amplifikovaných fragmentů enzymy *MseI* a *AluI*. Tyto profily zatím ještě nebyly v literatuře publikovány.

Sekvencování PCR produktu ze vzorku č. 6 (6. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 1/38/40 (IV)) a srovnání získaných sekvencí 16SrDNA (accession number: 552453), Tuf genu (accession number: 552455) a genu pro DNA helikázu (accession number: 552454) s daty dostupnými v GenBank ukázalo, že nejpříbuznější fytoplazmou je v případě 16S rDNA *Candidatus* Phytoplasma solani isolate 391 05 (accession number: EU010006), v Tuf genu Non-culturable plant-pathogenic bacteria sp. clone STOLF (accession number: L46370) a v genu pro DNA helikázu *Candidatus* Phytoplasma solani isolate 2CH (accession number: EF653374). Je tedy zřejmé, že výsledky sekvenční analýzy směřují k zařazení testované fytoplazmy do taxonu

*Candidatus* Phytoplasma solani spadající pod skupinu stolburu (XII-A), což potvrzuje předešlou PCR/RFLP analýzu.

Fytoplazma stolburu bramboru je karanténním mikroorganismem, jehož výskyt a opatření proti němu jsou ošetřeny Zákonem o rostlinolékařské péči a prováděcích předpisech č. 147/1996 Sb. Infekce tímto patogenem může způsobit ve výnosu brambor ztráty přesahující 80%, avšak tyto ztráty kolísají periodicky. Zvýšený výskyt fytoplazmy stolburu zřejmě vzrůstá se zvyšujícími se teplotami, kdy dochází ke zvýšené aktivitě vektorů.

Diagnostikovaná fytoplazma, která byla izolována z jetele lučního a po PCR/RFLP a sekvenční analýze směřuje k zařazení do skupiny stolburu resp. do taxonu *Candidatus* Phytoplasma solani, do něhož spadá fytoplazma stolburu bramboru, naznačuje možné riziko do budoucna, přestože je výskyt infikovaných rostlin šlechtitelského materiálu jetele lučního v současné době sporadický (8 nalezených symptomatických infikovaných rostlin použitých v práci). Nelze tedy podceňovat potenciál fytoplazmy stolburu bramboru na jeteli, pokud víme jaké výnosové ztráty může vykazovat na bramboru.

Dílní výsledky této práce budou použity na nadcházející konferenci The 3rd Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses, která se bude konat 20-23. srpna 2008, Ljubljana, Slovinsko (abstrakt 7.7.).

Výzkum zaštitěný grantem MZE ČR-NAZV zabývající se diagnostikou virů a fytoplazem ve šlechtitelském materiálu jetele lučního nadále pokračuje a jeho výsledky mohou mít kladný vliv na situaci v ochraně proti fytoplazmám.

## 6. Seznam použité literatury

- Alma, A., Bosco, ., Danielli, A., Bartaccini, M., Vibio, M., Arazone, A.** (1997) identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol Biol* 6, 115-121
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevehenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Wogenhout, 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
- Banttari, E. E., Zeyen, R. J.** (1979) Interactions of mycoplasma-like organism and viruses in dually infected leafhoppers, planthoppers, and plants. *Leafhopper vectors and plant disease agents*. 115, 327-347
- Battle, A., Martinez, M. A., Lavina, A.** (2000) Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 106, 811-816
- Bertaccini, A.** (2007) Phytoplasmas: diversity taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689
- Bertaccini, A., Martini, M., Paltrinieri, S., Brighetti, M., Davies, D., Fialová, R., Navrátil, M., Karešová, R., Fránová, J.** (2001) A molecular survey to identify phytoplasmas associated with apple trees showing different disease symptoms. *Acta Hort (ISHS)* 550, 371-376
- Břák, J.** (1979) Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. *Leafhopper vectors and plant disease agents*. 115, 97-154
- Davis, R.E., Dally, E.A., Gundersen, D.E., Lee, I.M., Habili, N.** (1996) Australian grapevine yellows phytoplasma is representative of a new Candidatus subspecies level taxon. *IOM Letters* 4, 276-277
- Davis, R.E., Dally, E.A., Gundersen, D.E., Lee, I.M., Habili, N.** (1997) "Candidatus Phytoplasma australiense," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 262-269
- Davis, R.E., Prince, J.P., Hamond, R.W., Dally, E.L., Lee, I.M.** (1992) Polymerase chain reaction detection of Italian Periwinkle Virescence mycoplasma-like organism (MLO) and evidence for relatedness with aster yellows MLOs. *Petria* 2, 184-193
- Deng, S., Hiruki, C.** (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. of Microb. Methods* 14, 53-61
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H.** (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the floem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witch's broom, aster yellows, or Paulownia witch's broom. *Ann. Phytopathol. Soc. JPN* 33, 259-266

- Duduk, B., Bertaccini, A.** (2006) Corn with symptoms of reddening: new host of stolbur phytoplasma. *Plant Diseases* 90, 1313-1319
- Favali, N. A., Musetti, R., Fossati, F., Vighi, C.** (2000) Association of stolbur phytoplasmas with diseased tomatoes in Italy. *Bulletin OEPP* 30, 347-350
- Fler, D., Furano, A.V.** (1980) Portions of the gene encoding elongation factor Tu are highly conserved in prokaryotes. *J Biol Chem* 255, 728-734
- Fos, A., Sanet, J.L., Zreik, L., Garnier, M., Bové, J.M.** (1992) Use of monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease* 76, 1092-1096
- Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, D., Boudon-Pardieu, E.** (2001) A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Plant. Pathol.* 107, 263-271
- Gibb, K.S., Padovan, A.C., Mogen, B.D.** (1995) Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85, 169-174
- Grylls, N. E.** (1979) Leafhopper vectors and the plant disease agents they transmit in Australia. *Leafhopper vectors and plant disease agents* 115, 179-213
- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T.** (1994) Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol* 176, 5244-5254
- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Schaff, D.A., Harrison, N.A., Chang, C.J., Davis, R.E., Kingsbury, D.T.** (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 68, 677-680
- Hoshi, A., Ishii, Y., Kakizawa, S., Oshima, K., Namba, S.** (2007) Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of Insectology* 60, 105-107
- Haggis, M., Sinha, R.C.** (1978) Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organism after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology* 68, 677-680
- Ho, K., Tsai, C., Chung, T.** (2001) Organisation of ribosomal RNA genes from a loofah with broom phytoplasma. *DNA & Cell Biology* 20, 115-22
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K., Asuyama, H.** (1967) Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 33, 267-275

- Jomantiene, R., Davis, R.E.** (2006) Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS microbiological Letters* 255, 59-65
- Kuske, C. R., Kirkpatrick, B. C.** (1992) Phylogenetic relationship between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 226-233
- Kúdela, V., Fucikovsky, L., Novacky, A.** (2002) *Rostlin lékařská bakteriologie*, 28, 92, 142
- Langer, M., Maixner, M.** (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA)
- Lavina, A., Batlle, A., Garcia-Faraco, J., Lopez-Herrera, C. J.** (2002) First report of stolbur phytoplasma in avocado in Spain. *Plant Disease* 86, 692
- Lee, I.M., Davis, R.E.** (1983) Phloem-limited prokaryotes in sieve elements isolated by enzyme treatment of disease plant tissues. *Phytopathology* 73, 1540-1543
- Lee, I.M., Davis R.E.** (1992) mycoplasma which infect plant and insects. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, ed. J. Maniloff, RN McE3lhansley, LR Finch, JB Varsman, 379-390. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E.**(2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 14, 254-256
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M.** (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S r RNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153-1169
- Lee, I.M., Gundersen, D.E., Davis, R.E., Bittner, K.D., Marcone, C., Semuller, E.** (2004) „*Candidatus phytoplasma asteris*“, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. J. of Syst. Evol. Bacteriol.* 54, 1037-1048
- Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E. , Gundersen, D.E.** (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842
- Lee, I.M., Davis R.E., Hiruki, C.** (1991) Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organism (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyse. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3565-3569
- Lim, P. O., Sears, B. B.** (1989) 16S rRNA sequence indicates dead plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 171, 5901-5906



- Lim, P.O., Sears, B.B.** (1992) Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma lidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequence. *Journal of Bacteriology* 174, 2606-2611
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U., Schleifer, K.H.** (1993) Phylogenetic relationships of *Bacteria* based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthetase  $\beta$ -subunit genes. *Antonie Leeuwenhoek* 64, 285-305
- Maixner, M., Ahrens, U., Seemüller, E.** (1995) Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* 101, 241-250
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Semüller, E.** (1999) Chromosome size of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89 (9), 805-810
- Marcone, C., Ragozzino, A.** (1995) Tomato big bud disease in southern Italy and characterisation of its casual agent by RFLP analysis. *Petria* 5, 195-205
- Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E.** (1997) Detection and identification of phytoplasmas in yellows – diseased weeds in Italy. *Plant Pathology* 46, 530-537
- Marzachi, C., Veratti, F., D'Aquilio, M., Vischi, A., Conti, M., Boccardo, G.** (2000) Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant Pathology* 82, 201-212
- Melamed, S., Tanne, E., Ben-Haim, R., Edelbaum, O., Yogev, M., Sela, I.** (2003) Identification and characterisation of phytoplasma genes, employing a novel method of isolating phytoplasmal genomic DNA. *Journal of Bacteriology* 22, 6513-6521
- Mertík, J., Navrátil, M., Kloudová, K., Válová, P., Šafářová, D.,** (2006) Molecular identification of stolbur phytoplasma infecting *Rhododendron* sp. in Czech republic. *XVII. Czech and Slovak Plant Protection Conference Prague*
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., Tsuchizaki, T.** (1993) Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 461-467
- Nielson, M. V.,** (1979) Taxonomic relationship of leafhoppers vectors of plant pathogens. *Leafhopper vectors and plant disease agents* 115, 3-27
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S.** (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, (<http://www.nature.com/naturegenetics/>)

**Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Lugli, A., Monari, W.** (2004) Three years of molecular monitoring of phytoplasma spreading in a plum growing area in Italy. *Acta Hort (ISHS)* 657, 501-506

**Paltrinieri, S., Martini, M., Stefani, E., Pondrelli, M., Bertaccini, A., Fideghelli, C.** (2001) Phytoplasma infection in peach and cherry in Italy. *Acta Hort. (ISHS)* 550, 365-370

**Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y.** (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094 – 1156

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

**Seemüller, E., Schneider, B., Mäurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., Stackebrandt, E.** (1994) Phylogenetic classification of phytopathogenic *Mollicutes* by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 440-446

**Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Pardieu, E.** (1998) The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) on the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *J. Phytopathol.* 146, 549-556

**Schaff, D.A., Lee, I.M., Davis, R.E.** (1992) Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1503-1509

**Schneider B., Gibb K.S., and Seemüller E.** 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *Tu* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Mycrobiology* 142:3381-3389

**Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C.** (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Microbiol* 143, 3381-3389

**Sears, B. B., Kirkpatrick, B. C.** (1994) Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* 60, 307-312

**Seruga, M., Skoric, D., Kozina, B., Mitrev, S., Krajacic, M., Perica, M. C.** (2003) Molecular identification of phytoplasma infecting grapevine in the republic of Macedonia. *Vitis* 42, 181 – 184

**Stackebrandt, E., Goebel, B.** (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849

**The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group** (2004) ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology* 54, 1243-1255

- Tsa, J.H.**, (1979) vector transmission of mycoplasma agent of plant diseases. *The Mycoplasmas*, ed. RF Whitcomb, JG Tully 3, 265-307. New York: Academic
- Toth, K.F., Harrison, N.A., Sears, B.B.** (1994) Phylogenetic relationship among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 119-124
- Viczian, O., Süle S., Gaborjanyi, R.** (1998) Detection and identification of stolbur phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. *Acta Phytopath. Ent. Hung.*, 33, 255-260
- Waters, H., Osborne, I.** (1978) Preliminary studies upon lethal yellowing and the distribution of MLO in coconut palms. *Pro. Meet. Int. Counc. Lethal Yellowing* 3, 78, Univ. Fla. Ind. Food Agric. Sci., Agric. Exp. Sta., Gainesville
- 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

## 7. Přílohy

Obrázky: legenda

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

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1. jetel luční - Hladké Životice (26.5. 2005) 25/17/14 (I)  | dále jen <b>1</b>   |
| 2. jetel luční - Hladké Životice (26.5. 2005) 26/16/33 (II) | dále jen <b>2</b>   |
| 3. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 25/5/48 (I)   | dále jen <b>3</b>   |
| 4. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 1/37/42 (II)  | dále jen <b>4</b>   |
| 5. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 6/13/20 (III) | dále jen <b>5</b>   |
| 6. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 1/38/40 (IV)  | dále jen <b>6</b>   |
| 7. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 1/46/46 (V)   | dále jen <b>7</b>   |
| 8. jetel luční - Hladké Životice (14.6. 2005) 3/21/36 (VI)  | dále jen <b>8</b>   |
| Mol. Molliere disease (28.11. 2005)                         | dále jen <b>Mol</b> |
| V1. negativní kontrola (voda) master mix s primery          | dále jen <b>V1</b>  |
| V2. negativní kontrola (voda) master mix s primery          | dále jen <b>V2</b>  |

\* čísla 1.,2., ...8. udávají číslo vzorku

\* datum v závorce udává datum izolace vzorku

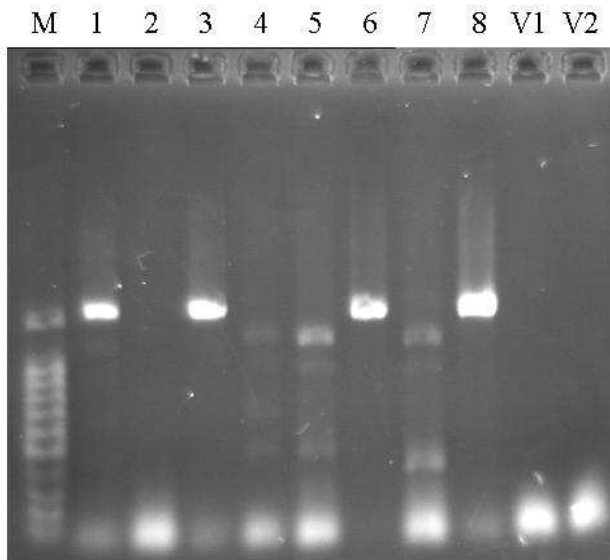
\* číslo ve formátu xx/xx/xx udává interní polní označení rostliny

\* římská číslice v závorce udává číslo vzorku v rámci izolace

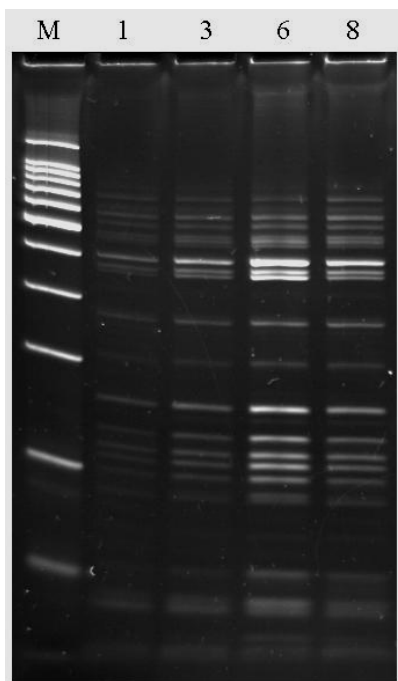
\* „dále jen“ 1 až V2 označení na fotografiích

## 7.1. 16S rDNA

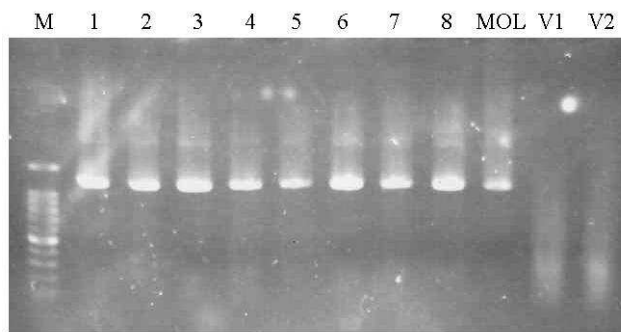
obr. A1: direct PCR s primery **P1/P7** (marker a popis vzorků viz. legenda)



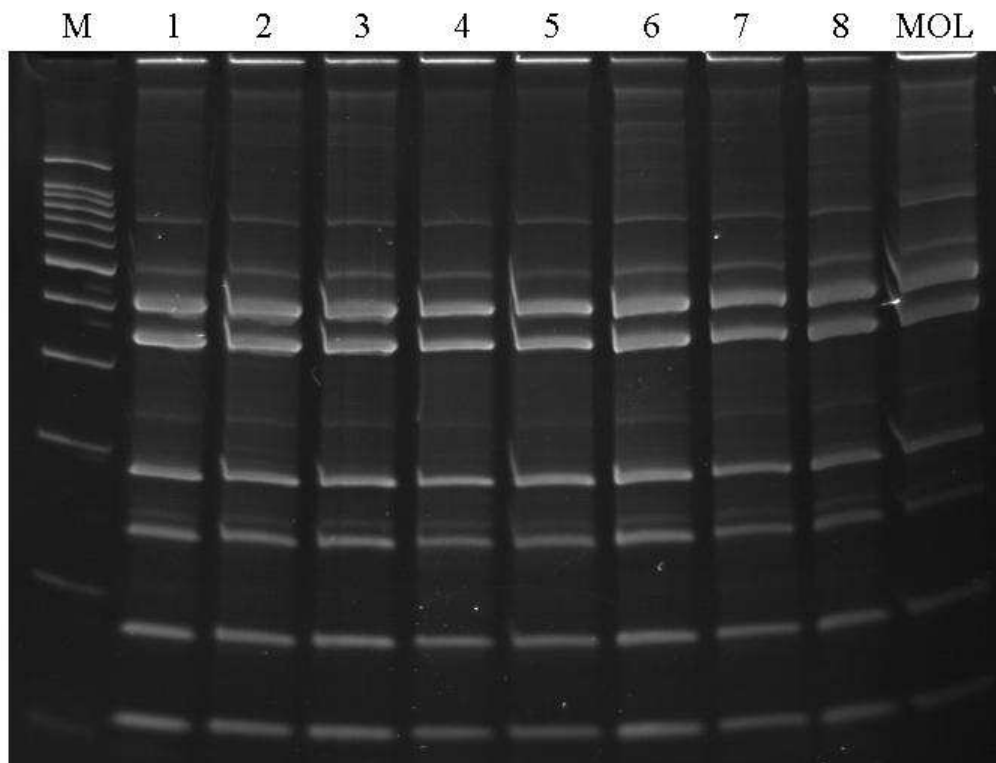
obr. A2: štěpení enzymem *TruI*, po direct PCR s primery P1/P7 (marker a popis vzorků viz. legenda)



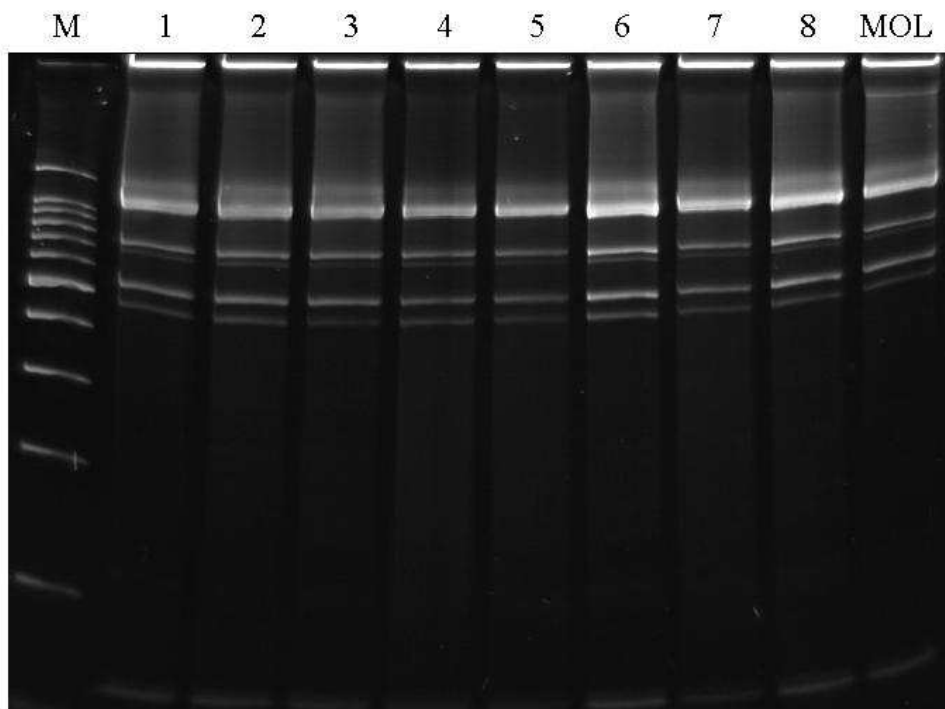
obr. B1: nested PCR s primery **P1/P7**→**R16F2n/R16R2** (marker a popis vzorků viz. legenda)



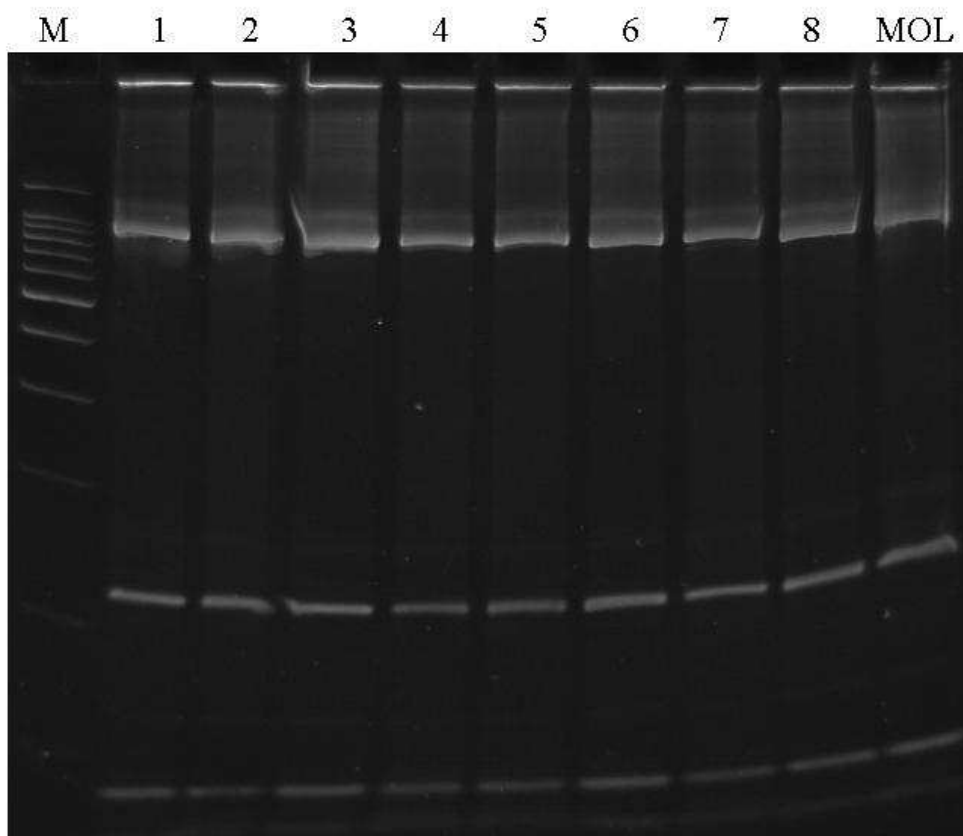
obr. B2: štěpení enzymem *AluI*, po nested PCR s primery **P1/P7**→**R16F2n/R16R2** (marker a popis vzorků viz. legenda)



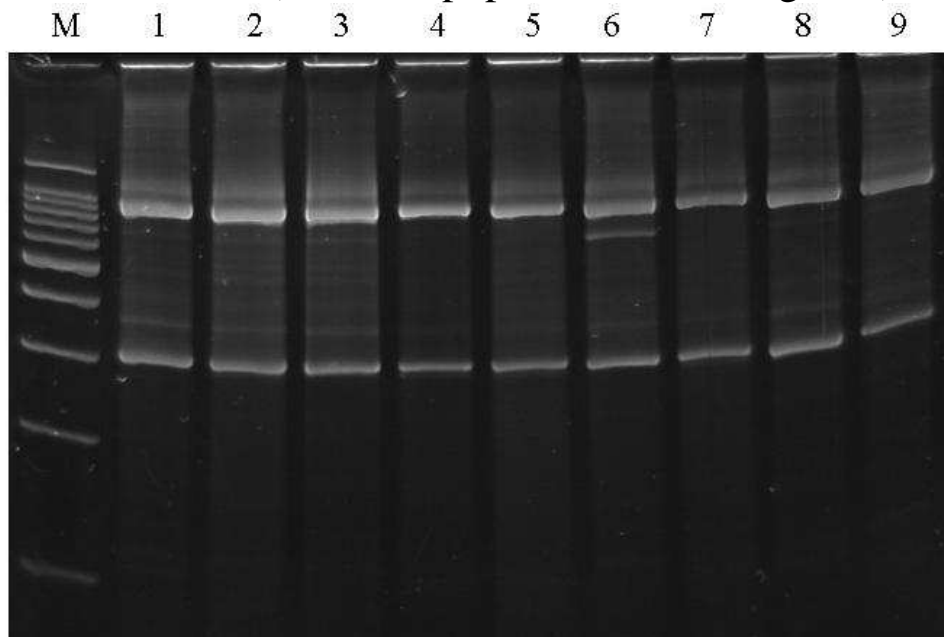
obr. B3: štěpení enzymem *BfaI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)



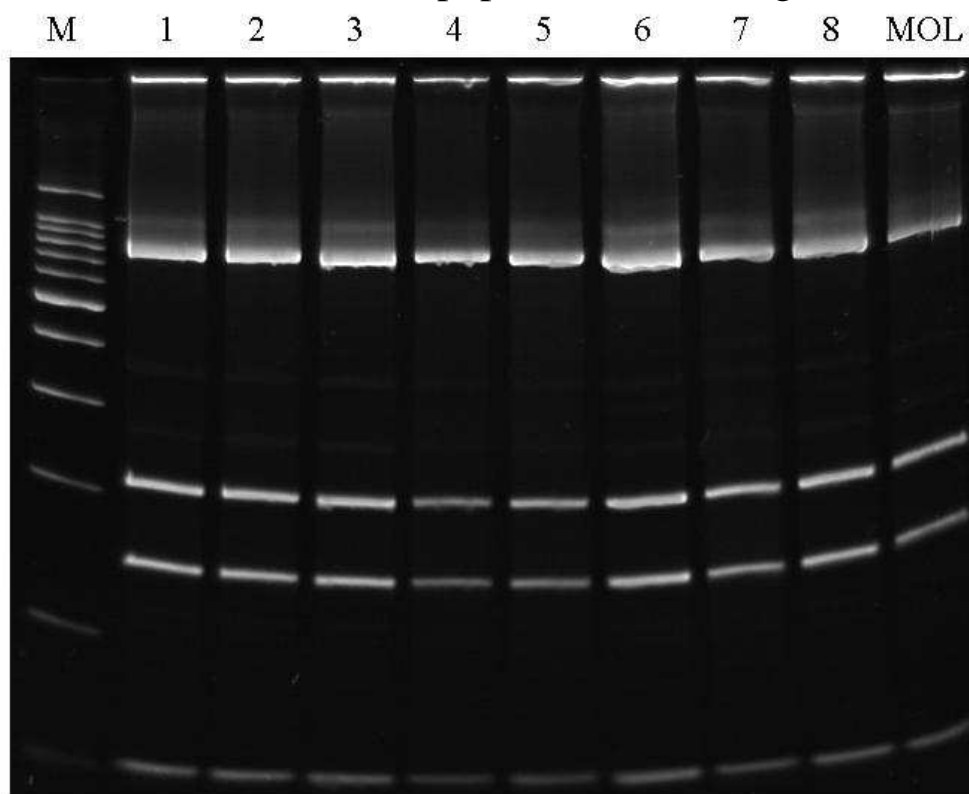
obr. B4: štěpení enzymem *HaeIII*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)



obr. B5: štěpení enzymem *HhaI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)

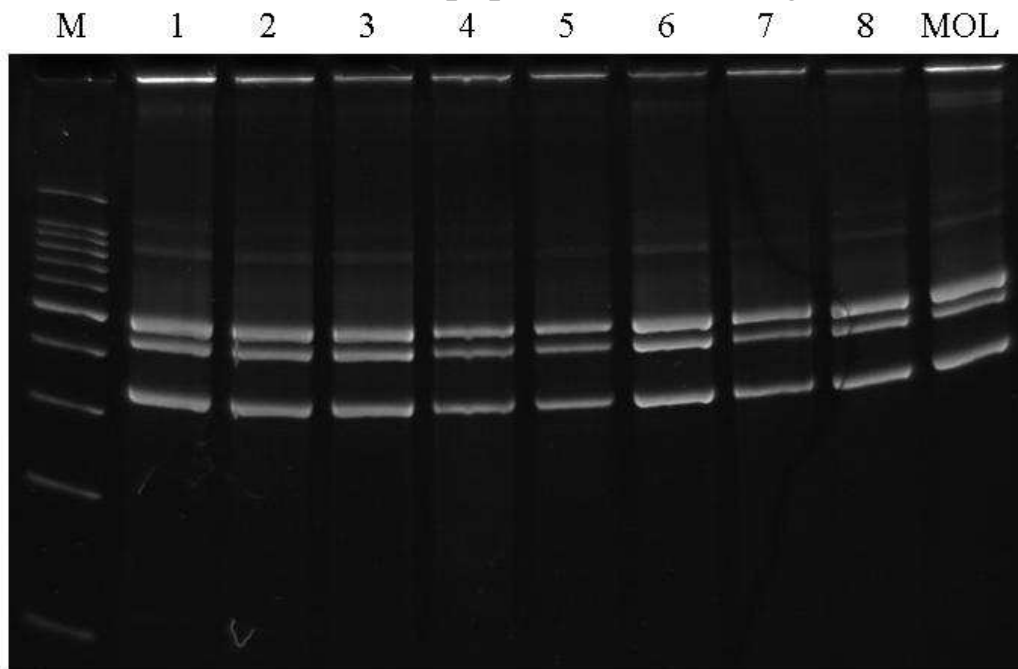


obr. B6: štěpení enzymem *HpaII*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)

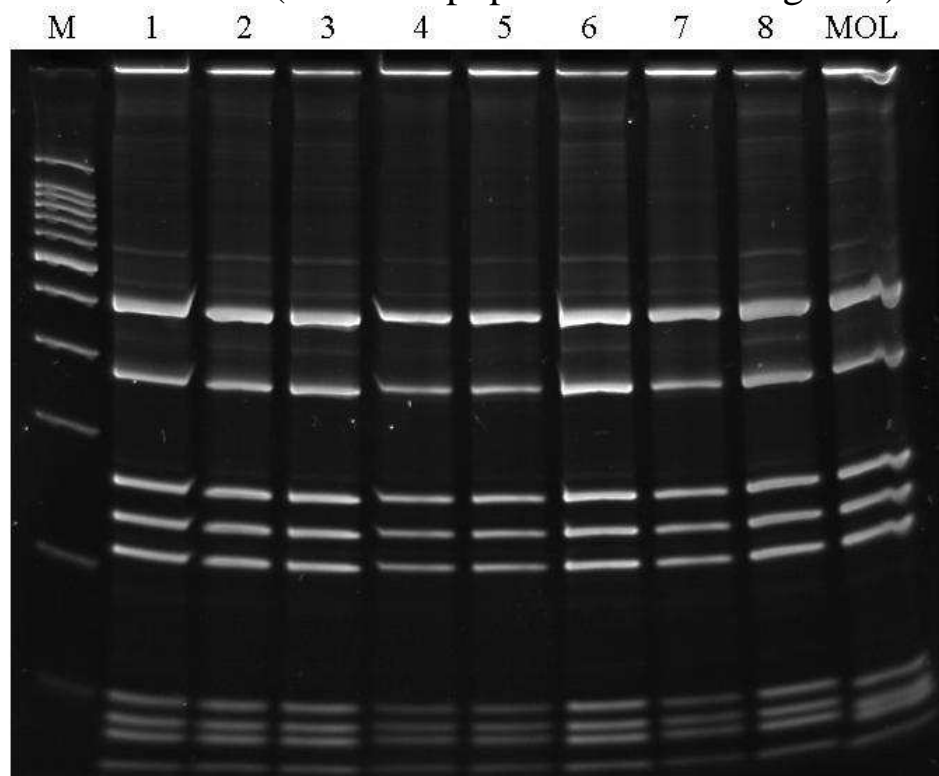




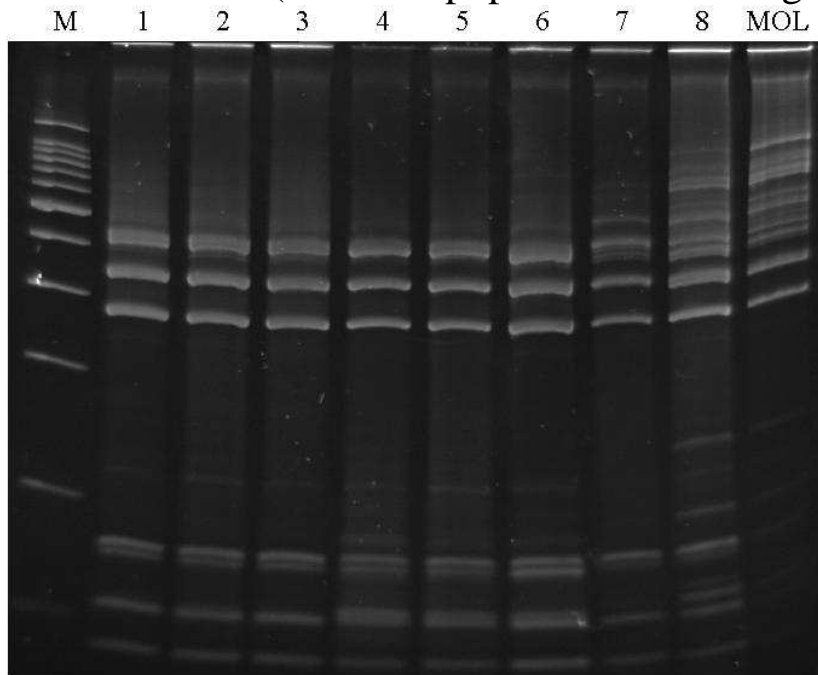
obr. B7: štěpení enzymem *KpnI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)



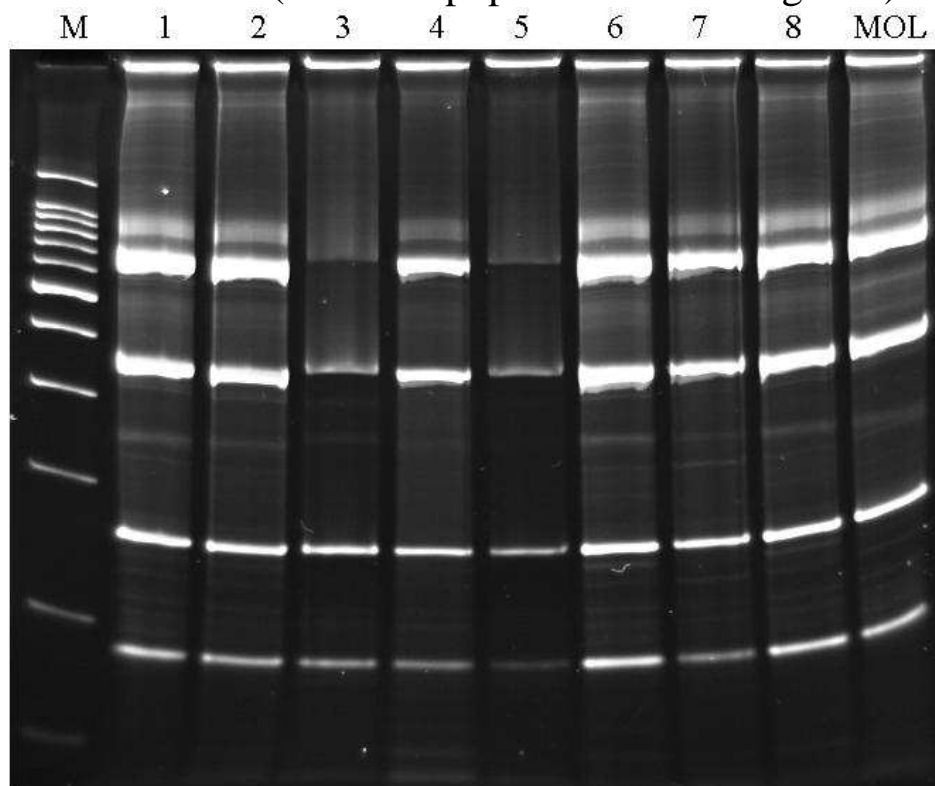
obr. B8: štěpení enzymem *MseI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)



obr. B9: štěpení enzymem *RsaI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)

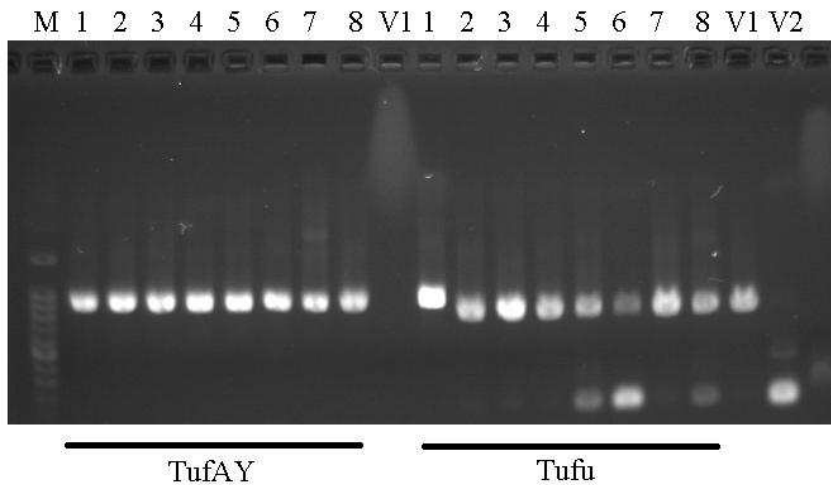


obr. B10: štěpení enzymem *TaqI*, po nested PCR s primery P1/P7→F2/R2 (marker a popis vzorků viz. legenda)

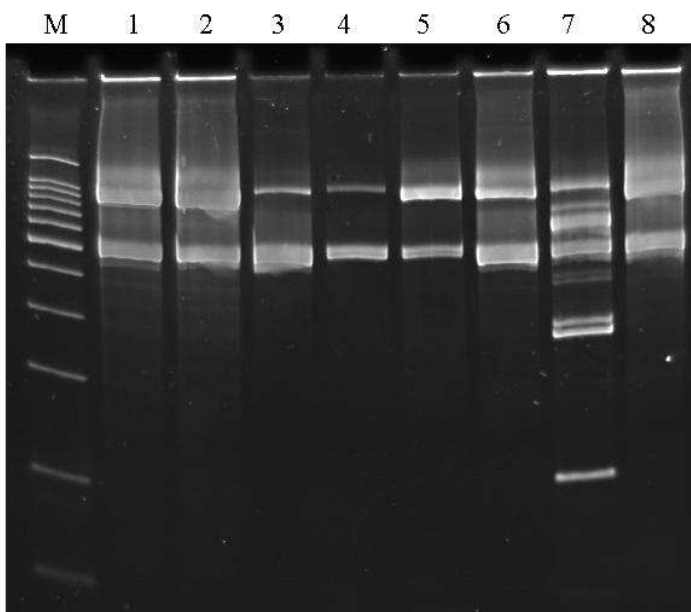


## 7.2. Elongační faktor - Tuf gen

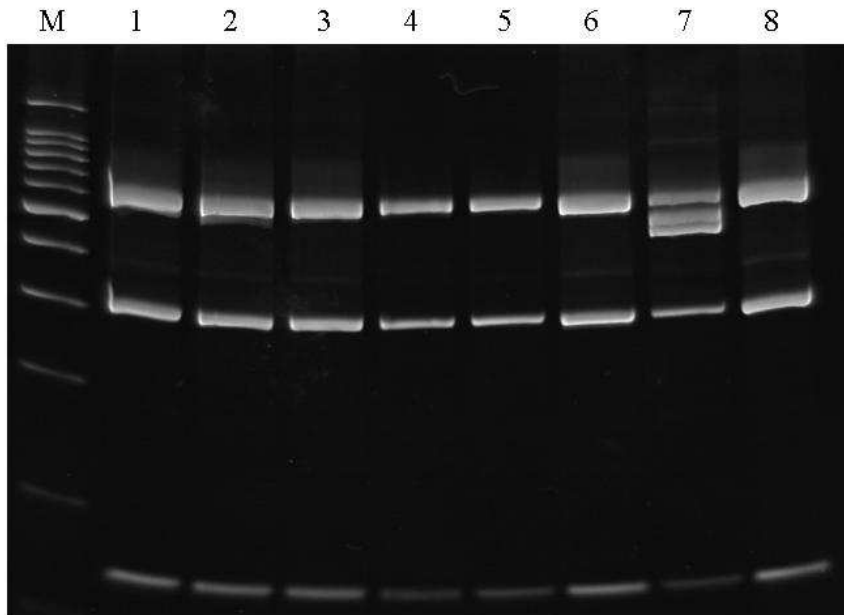
obr. 1: nested PCR s primery **fTuf1/rTuf1**→**fTufAY/rTufAY**(A)  
a nested PCR s primery **fTuf1/rTuf1**→**fTufu/rTufu**(B) (marker a  
popis vzorků viz. legenda)



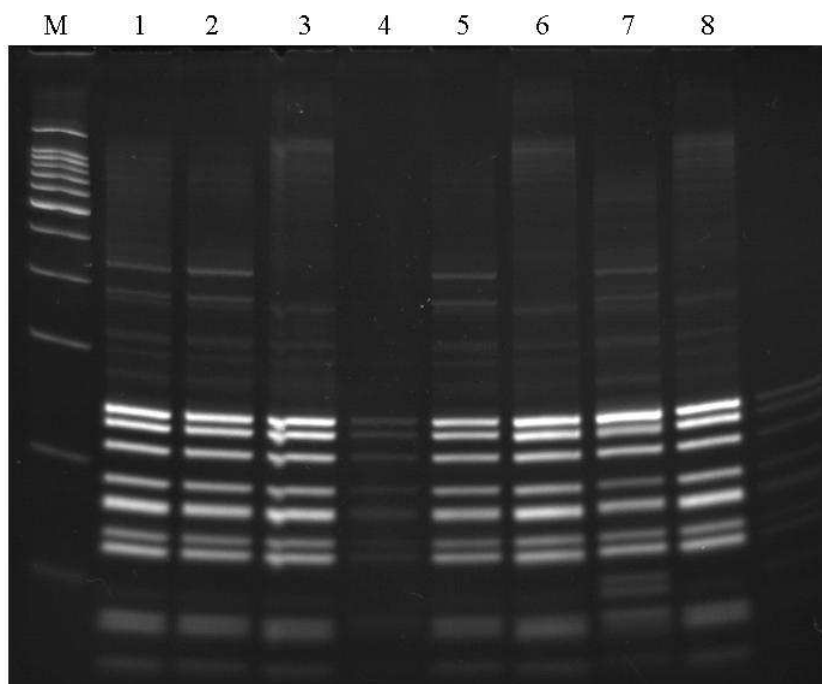
obr. A1: štěpení enzymem **BspI**, po nested PCR s primery  
**fTuf1/rTuf1**→**fTufAY/rTufAY** (marker a popis vzorků viz.  
legenda)



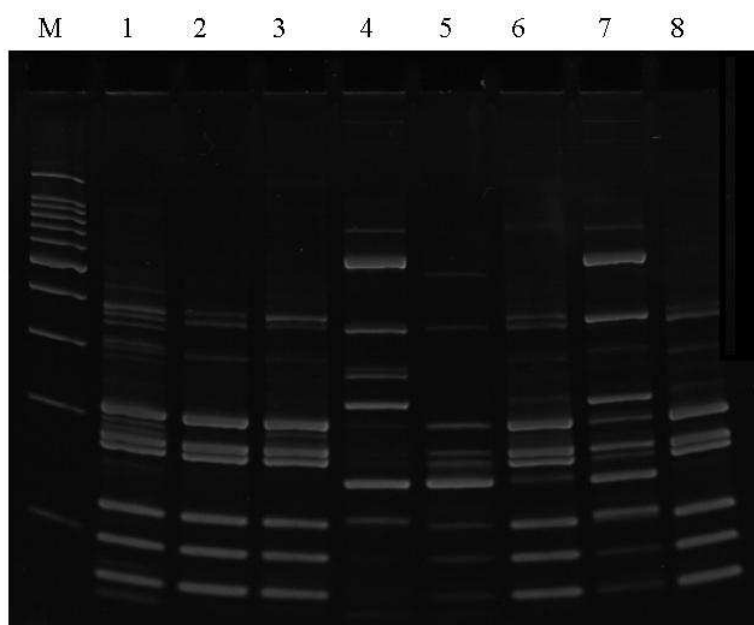
obr. A2: štěpení enzymem *HpaII*, po nested PCR s primery fTuf1/rTuf1 → fTufAY/rTufAY (marker a popis vzorků viz. legenda)



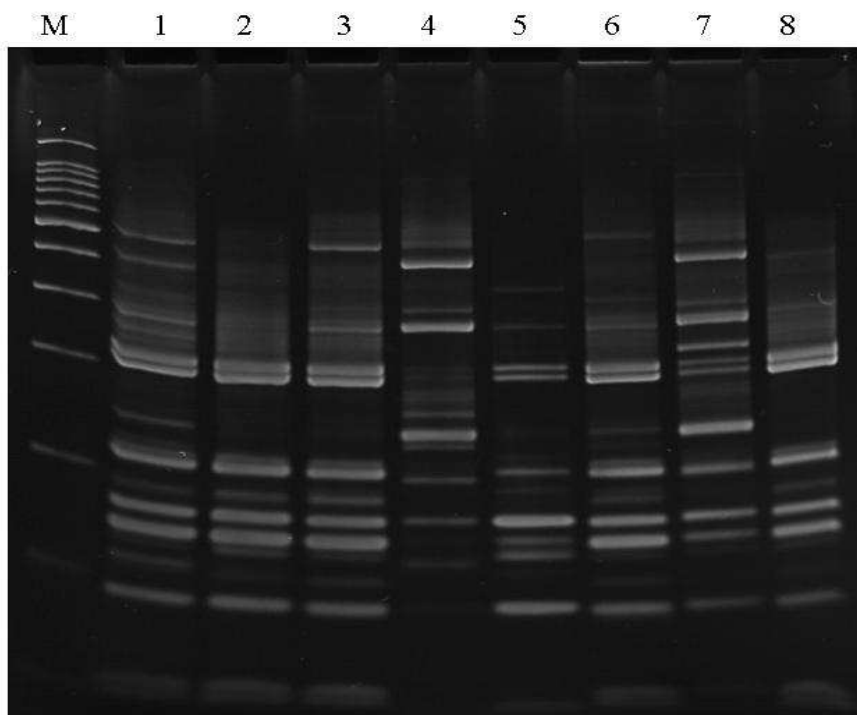
obr. A3: štěpení enzymem *TruI*, po nested PCR s primery fTuf1/rTuf1 → fTufAY/rTufAY (marker a popis vzorků viz. legenda)



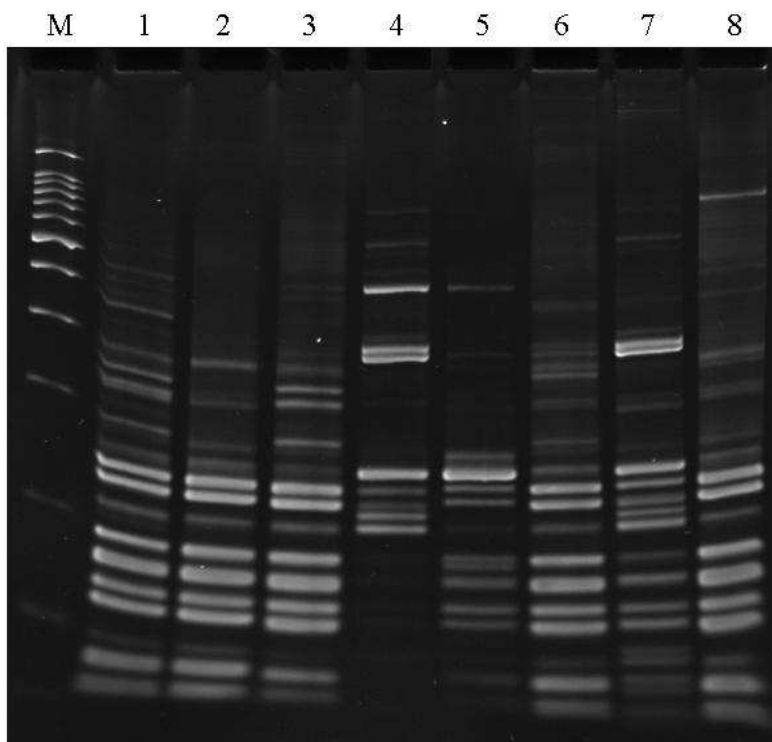
obr. **B1**: štěpení enzymem *AluI*, po nested PCR s primery  
fTuf1/rTuf1 → fTufu/rTufu (marker a popis vzorků viz. legenda)



obr. **B2**: štěpení enzymem *TasI*, po nested PCR s primery  
fTuf1/rTuf1 → fTufu/rTufu (marker a popis vzorků viz. legenda)

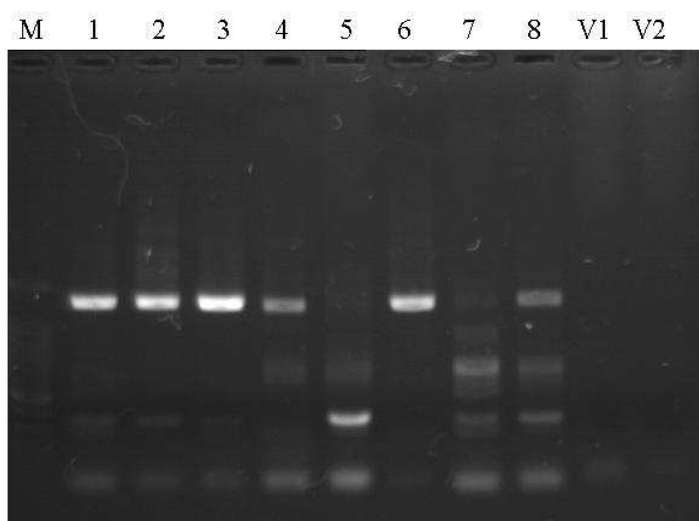


obr. B3: štěpení enzymem *TruI*, po nested PCR s primery fTuf1/rTuf1 → fTufu/rTufu (marker a popis vzorků viz. legenda)

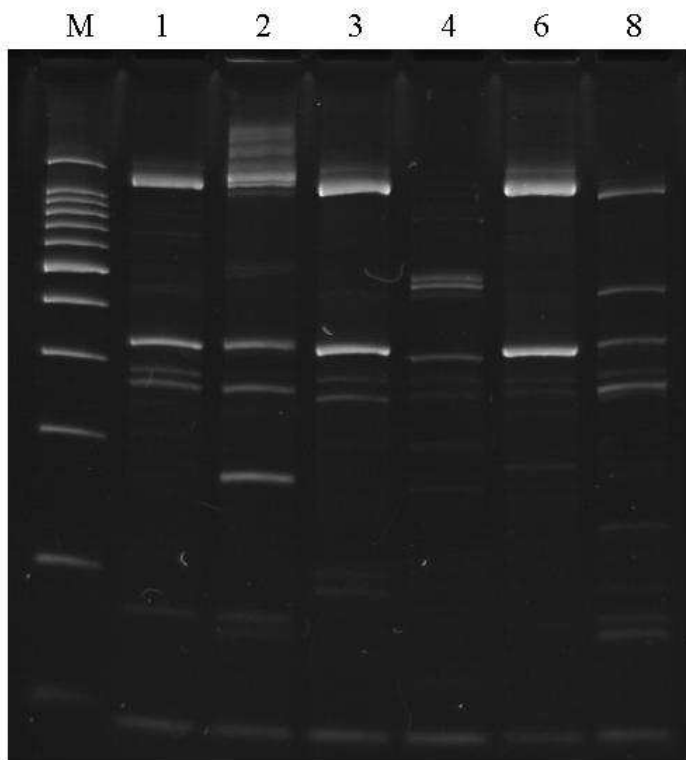


### 7.3. Gen pro DNA helikázu

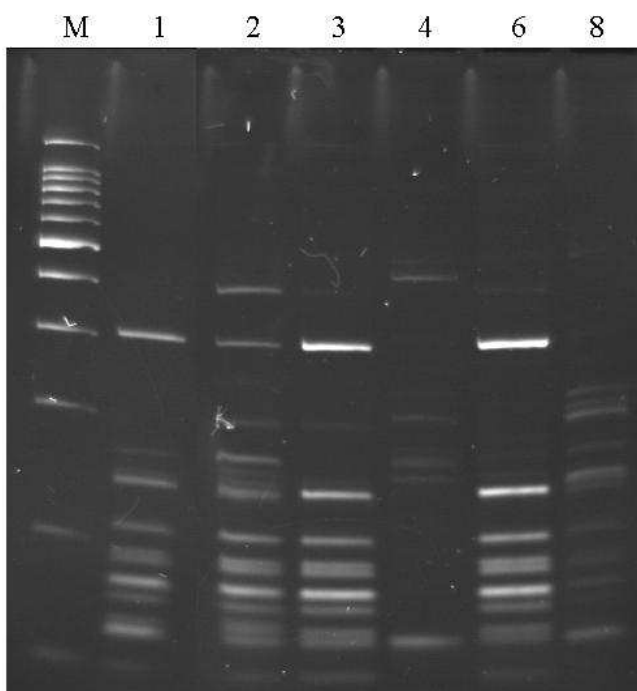
obr. 1: direct PCR s primery G35 p/m (marker a popis vzorků viz. legenda)



obr. 2: štěpení enzymem *AluI*, po direct PCR s primery G35 p/m  
(marker a popis vzorků viz. legenda)



obr. 3: štěpení enzymem *MseI*, po direct PCR s primery G35 p/m  
(marker a popis vzorků viz. legenda)



## 7.4. Sekvencování

obr. 1a: sekvence 16S rDNA, 1532b (GenBank accession number: EU552453)

```
1 CCTAGCAATA GGTATGCTTA GGGGAAGAGCT TGCCTCACAT TAGTTAGTTG GTGGGGTAAT
61 GGCCTACCAA GACGATGATG TGTAGCCGGG CTGAGAGGTC GAACGGCCAC ATTGGGACTG
121 AGACACGGCC CAAACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTAAGGAA TTTTCGGCAA TGGAGGAAAC
181 TCTGACCGAG CAATGCCGCG TGAACGATGA AGTATTTCCG TACGTAAAGT TCTTTTATTA
241 GGGGAAGAAA GATGGTGGAA AAACCATTAT GACGGTACCT AATGAATAAG CCCC GGCTAA
301 CTATGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACATAG GGGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG
361 TAAAGGGTGC GTAGGCGGTT AAATAAGTTT ATGGTCTAAG TGCAACGCTC AACGTTGTGA
421 TGCTATAAAA ACTGTTTAGC TAGAGTTGGA TAGAGGCAAG TGGAAATCCG TGTGTAGTGG
481 TAAAATGCGT AAATATACGG AGGAACACCA GAAGCGAAGG CCGCTTGCTG GGTCTTAACT
541 GACGCTGAGG CACGAAAGCG TGGGAGGCAA ACAGGATTAG ATACCTTGGT AGTCCACGCC
601 CTAACGATG AGTACTAAAC GTTGGATAAA ACCAGTGTG AAGTTAACAC ATTAAGTACT
661 CCGCCTGAGT AGTACGTACG CAAGTATGAA ACTTAAAGGA ATTGACGGGA CTCCGCACAA
721 GCGGTGGATC ATGTTGTTTA ATTCGAAGGT ACCCGAAAAA CCTCACAGG TCTTGACATG
781 CTTTTGCAAA GCTGTAGAAA TACAGTGGAG GTTATCAGAA GCACAGGTGG TGCATGGTTG
841 TCCTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTGTGTT
901 TAATTGCCAT CATTAAAGTTG GGGACTTTAG CAAGACTGCC AATGATAAAT TGGAGGAAGG
961 TGGGGGACGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACAAACGT GATACAATGG
1021 CTGTTACAAA GGGTAGCTAA AGCGTAAGCT TCTGGCGAAT CTCAAAAAAG CAGTCTCAGT
1081 TCGGATTGAA GTCTGCAACT CGACTTCATG AAGTTGGAAT CGTAGTAAT CGCGAATCAG
1141 CATGTCGCGG TGAATACGTT CTCGGGGTTT GTACACACCG CCCGTCAAAC CACGAAAGTT
1201 GGCAATACCC AAAGCCGGTG GCCTAACTTG AGCAATCAAG AAGGAGCCGT CTAAGGTAGG
1261 GTTGATGATT GGGGTTAAGT CGTAAACAAG TATCCCTACC GGAAGGTGGG GATGGATCAC
1321 TCTCTTTCTA AGGATAAAGT TATCATCTTC AGTTTTGAGA GACTTAAAGAA AGTTTTTCAT
1381 TTTTTAAGAT TCGGGCCTAT AGCTCAGCTG GTTAGAGCAC ACGCCTGATA AGCGTGAGGT
1441 CGGTGGTTCA AGTCCATTTA GGCCACCAA AATAGGTCAC ATCTTAAAAA AGCTCTTTGA
1501 AAAGTAGATA AACAAAGGTT AGAAAATTA AG
```

obr. 1b: nejpříbuznější fytoplazma v 16S rDNA, 1734b (GenBank accession number: EU010006); *Candidatus* Phytoplasma solani isolate 391 05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and tRNA-Ile gene, complete sequence; and 23S ribosomal gene, partial sequence (Pacífico a kol., 2007)

```
1 GAAGTTTAAAG CAATTAAGCT TTAGTGGCGA ACGGGTGAGT AACGCGTAAG CAATCTGCCC
61 CTAAGACGAG GATAACAGTT GGAAACGACT GCTAAGACTG GATAGGAGAT AAGAAGGCAT
121 CTTCTTATTT TTTAAAGACC TAGCAATAGG TATGCTTAGG GAAGAGCTTG CGTCACATTA
181 GTTAGTTGGT GGGGTAATGG CCTACCAAGA CGATGATGTG TAGCCGGGCT GAGAGGTCTGA
241 ACGGCCACAT TGGGACTGAG ACACGGCCCA AACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAAGGAATT
301 TTCGGCAATG GAGGAAACTC TGACCGAGCA ATGCCGCGTG AACGATGAAG TATTTCCGTA
361 CGTAAAGTTC TTTTATTAGG GAAGAAAAGA TGGTGGAAAA ACCATTATGA CGGTACCTAA
421 TGAATAAGCC CCGGCTAACT ATGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACATAGGG GGCAAGCGTT
481 ATCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGTGCGT AGGCGGTTAA ATAAGTTTAT GGTCTAAGTG
541 CAACGCTCAA CGTTGTGATG CTATAAAAAAC TGTTTAGCTA GAGTTGGATA GAGGCAAGTG
601 GAATTCCGTG TGTAAGTGGTA AAATGCGTAA ATATACGGAG GAACACCAGA AGCGAAGGCCG
661 GCTTGCTGGG TCTTAACTGA CGCTGAGGCA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT
721 ACCCTGGTAG TCCAGCCCTC AAACGATGAG TACTAAACGT TGGATAAAAA CAGTGTGAA
781 GTTAAACAT TAAGTACTCC GCCTGAGTAG TACGTACGCA AGTATGAAA TTAAGGAAT
841 TGACGGGACT CCGCACAAGC GGTGGATCAT GTTGTTTAAT TCGAAGGTAC CCGAAAAACC
901 TCACCAGGTC TTGACATGCT TTTGCAAAGC TGTAGAAATA CAGTGGAGGT TATCAGAAGC
961 ACAGGTGGTG CATGGTTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC
1021 GAGCGCAACC CTTGTTGTTA ATTGCCATCA TTAAGTTGGG GACTTTAGCA AGACTGCCAA
1081 TGATAAATTG GAGGAAGGTG GGGACGACGT CAAATCATCA TGCCCTTAT GACCTGGGCT
1141 ACAAACGTGA TACAATGGCT GTTACAAAGG GTAGCTAAAG CGTAAGCTTC TGGCGAATCT
1201 CAAAAAGCA GTCTCAGTTC GGATTGAAGT CTGCAACTCG ACTTCATGAA GTTGGAAATCG
```



```

1261 CTAGTAATCG CGAATCAGCA TGTCGCGGTG AATACGTTCT CGGGGTTTGT ACACACCGCC
1321 CGTCAAACCA CGAAAGTTGG CAATACCCAA AGCCGGTGGC CTAACTTGAG CAATCAAGAA
1381 GGAGCCGTCT AAGGTAGGGT TGATGATTGG GGTAAAGTCG TAACAAGGTA TCCCTACCGG
1441 AAGGTGGGGA TGGATCACCT CTTTCTAAG GATAAAGTTA TCATCTTCAG TTTTGAGAGA
1501 CTTAAGAAAAG TTTTTCATTT TTTAAGATTC GGGCCTATAG CTCAGCTGGT TAGAGCACAC
1561 GCCTGATAAG CGTGAGGTCG GTGGTTC AAG TCCATTTAGG CCCACCAAAA TAGGTCACAT
1621 CTTAAAAAAG CTCTTTGAAA AGTAGATAAA CAAAGGTTAG AAAATTTAAAG GAACTAAGGG
1681 CGCACAGTGG ATGCCTTGGC ACTAAGAGCC GATGAAGGAA TCACTAGTGA ATTC

```

obr. 2a: sekvence **Tuf gen**, 1001b (GenBank accession number: EU552455)

```

1 ACTACTTACA GCTGCATCAT CAGTGTTAGC TTCTCAGGGT TAGCTAAAAG TAGAGCTTAT
61 GACCAAATTG ATAACGCTCC TGAAGAAAAG GAACGTGGAA TTACGATTAA AACTTCTCAC
121 GTTGAATATG AAACATCAAA AAGACACTAT GCTCACGTTG ATTGTCCAGG ACACGCCGAT
181 TATATTAATA ACATGATTAC TGGTGCTGCT CAAATGGATG CCGCTATTTT AGTAGTTTCT
241 GGCAGAGATA GTGTTATGCC TCAAACCTAGA GAACATATTT TGTTAGCTCG CCAAGTAGGG
301 GTTCCATAAA TTGTTGTTTT CTTAAACAAA TGTGACCTTT GTCCGGATGA AGAAATTTTA
361 GAATTAGTTG AAATGGAAGT CCGTGAATTA TTATCTAAAT ATGATTTTCC GGGCGATGAT
421 ACCCCTATTA TTAGAGGTTT TCGTGTAAAA GCTTTAGAAG GTGACAAAACA TTACATTGCA
481 CAAGTTAACG AATTAATCAA CGCTTTAGAT TCTTACATTG AAGATCCAGT GCCTGAAGTT
541 GATAAACCTT TCTTAATGCC AGTCGAAGAT GTTTTCACTA TCACTGGTAG AGGAACAGTA
601 GTTACTGGTA GAGTTGAAAG AGGACAAGTT AAAGCTGGTG ATGAAATAGA AATCATAGGT
661 CTTAAAGACA CTAGAAAAAC CATCGTAACA GCAATTGAAA TGTTTAAAAA AGATTTAGAT
721 TTTGCTCAAG CAGGCGATAA CGTTGGAGCT TTGTTGCGTG GAATTAACCG TGAAGATGTT
781 CAACGTGGTC AAGTGTTAGC CAAACCAGGT TCTGTGAAAC CTCATTTTCA ATTTGTGGCG
841 CAAGCTTATA TCTTAATAA AGAAGAAGGA GGACGACACA CTGCCTTTTT TTCCAATAC
901 CGTCCGCAAT TCTATTTCCG TACAACGAT ATTACAGGAG TTGTTGAATT ACAAGGTGAT
961 GTTAAAATGG TTATGCCAGG TGACAACGTT GAATTAACGT T

```

obr. 2b: nejpříbuznější fytoplazma v **Tuf genu**, 977b (GenBank accession number: L46370); Non-culturable plant pathogenic bacteria sp. clone STOLF alengation factor EF-TU (*tuf*) gene, partial cds. (Schneider a kol., 2005)

```

1 GGGTTAGCTA AAAGTAGAGC TTATGACCAA ATTGATAACG CTCCTGAAGA AAGAGAACGT
61 GGAATTACGA TTA AAACTTC TCACGTTGAA TATGAAACAT CAAAAAGACA CTATGCTCAC
121 GTTGATTGTC CAGGACACGC CGATTATATT AAAAAATGA TTAGTGGTGC TGCTCAAATG
181 GATGCCGCTA TTTTAGTAGT TTCTGGCGCA GATAGTGTTA TGCTCAAAC TAGAGAACAT
241 ATTTTGTTAG CTCGCCAAGT AGGGGTTTCT AAAATTGTTG TTTTCTTAAA CAAATGTGAC
301 CTTTGTCCGG ATGAAGAAAT TTTAGAATTA GTTGAAATGG AAGTCCGTGA ATTATTATCT
361 AAATATGATT TTCCGGGCGA TGATACCCCT ATTATTAGAG GTTCTGCGTT AAAAGCTTTA
421 GAAGGTGACA AACATTACAT TGCACAAGTT AACGAATTA TCAACGCTTT AGATTCTTAC
481 ATTGAAGATC CAGTGCCTGA AGTTGATAAA CCTTTCTTAA TGCCAGTCGA AGATGTTTTT
541 ACTATCACTG GTAGAGGAAC AGTAGTACT GGTAGAGTTG AAAGAGGACA AGTTAAAGCT
601 GGTGATGAAA TAGAAATCAT AGGTCTTAAA GACTAGATA AAACCATCGT AACAGCAATT
661 GAAATGTTTA AAAAAGATTT AGATTTTGCT CAAGCAGGCG ATAACGTTGG AGCTTTGTTG
721 CGTGGAAATTA ACCGTGAAGA TGTTCAACGT GGTCAAGTGT TAGCCAAAAC AGGTTCTGTG
781 AAACCTCATT TTCAATTTGT GGCAGCAAGCT TATATCTTAA CTAAGAAGA AGGAGGACGA
841 CACACTGCCT TTTTTTCCCA ATACCGTCCG CAATTCTATT TCCGTACAAC TGATATTACA
901 GGAAGTTGTTG AATTACAAGG TGATGTTAAA ATGGTTATGC CAGGTGACAA CGTTGAATTA
961 ACTGTTACTT TAAACAAA

```

obr. 3a: sekvence **gen pro DNA helikázu**, 1153b (GenBank accession number: EU552454)

```

1 CCAAGTCATT GATTGTTTTT TACCCCAAGC AAACATCTTT TTACAAACAT TACTGACTAA
61 CCAATTCCTC CTTTTTAGCG ATATTAACAT GATTA AAAAT AAAAAATAAG GAGTTAATAT

```

```

121 AAAATGTTAA CCAACGAACA ACGCGCCTTG CAACAAGTCA TATCTTATAT CGAACAAAGGC
181 CAATGGGAAA AGGCAAACCT TTATTGCCAA ATCATCAACC CCCAAACCCT ACTTGACCCC
241 AACAAACAAA AAATATTTAC AGCTTTAAAA TATTTATTTT TAGAAAAACA AACATCTCAT
301 CCTTGGGATA AAATCAAATC TCAAACGGAG ATAATCCAAG AATTAATCAC CTATCTTCAA
361 ACCCATTTTC CCCAAGATAA CTTTACGAAA GAATCACTAT CTTTTTTAAG TGATAATTTT
421 AATGAGGAAA ACAACCTTGA TTTTTTAGAT AACCTAAAAA ACACCTATAA CCAAGAAAAA
481 TTGTTCCAAC AACTCTTAAA AATCATTAGT CCTTCTTTTG AAAACAAGGA TCCTTATCAC
541 AAACATTTT ATTATCAAGA AATCTTTGAT AAATTAAGAA AATTTATGGC TTTTATTCCT
601 CACAAAAATG ATAAAAACT CTTTAATTTA AATCAAATGG CTCTTGTC A TCCTGAATTT
661 TTTGAGTCCA ATCAACAAGC CAAACAAAAA ATTCAAGAAG AATATTACCG CCTATCAGAA
721 CCTTCAAAG GATTAATCA AGCCACGAAA GGCTTTAAAA AAGGTCAAAT TATCACCATT
781 GGGGGCTATA CTGGTTTAGG AAAAAACCACT TTTGTCTACA ACCTTTTAAT AGACATTTCA
841 AAAACCAAA ATCAAGAAAC AAACAACAT CCAAATATGT TGGTATTTTC TTATGAAATG
901 ACCTTAGAAG AAAATTTAAG TCGTTTATTA GCCCACCAA CTCAAATTCC TTTAGATATT
961 ATTTTAGATA AAAATTTTGA AGACTCAAAC ATCACACAAC ACACCTACAC GGAAAGGATG
1021 AAGACCGCAA AACAATTATT CGCCAACATA AATTTATCAT TCAGTTACGA TAAAGGCAAA
1081 AATATTGATT ACGTCATTGA TTTAGTTTAT CGCCTCTATT TGGAAACAAA AATCGAAATC
1141 ATCGTCATTG ACC

```

obr. 3b: nejpříbuznější fytoplazma v genu pro DNA helikázu (GenBank accession number EF653374); *Candidatus* Phytoplasma solani isolate 2CH replicative DNA helicase gene, partial cds. (Seruga a kol., 2007)

```

1 TAACACTGTG GAAGCTCAAA GATTAAAACAA GAAAAACAAA CAAGGGAGAA TCTTAGGAAT
61 TAACCAAGTC ATTGATTGTT TTTTACCCCA AGCAAACATC TTTTACAAA CATTACTGAC
121 TAACCAATTC CTCCCTTTTA GCGATATTA CATGATTAAA AATAAAAAAT AAGGAGTTAA
181 TATAAAATGT TAACCAACGA ACAACGCGCC TTGCAACAAG TCATATCTTA TATCGAACAA
241 GGCCAATGGG AAAAGGCAAA CTTTTATTGC CAAATCATCA ACCCCCAAAC CCTACTTGAC
301 CCAACAACA CAAAAATATT TACAGCTTTA AAATATTTAT TTTTAGAAAA ACAAACATCT
361 CATCCTTGGG ATAAAATCAA ATCTCAAACG GAGATAATCC AAGAATTAAT CACCTATCTT
421 CAAACCCATT TTCCCAAGA TAACTTTACG AAAGAATCAC TATCTTTTT AAGTGATAAT
481 TTTAATGAGG AAAACAACCT TGATTTTTTA GATAACCTAA AACACACCTA TAACCAAGAA
541 AAATTGTTCC AACAACCTTT AAAAAATCATT AGTCCTTCTT TTGAAAACAA GGATCCTTAT
601 CACAAACATT TTTATTATCA AGAAATCTTT GATAAATTA GAAAATTTAT GGCTTTTATT
661 CCTCACAAAA ATGATAAAAC ACTCTTTAAT TTAAATCAAA TGCTTCTTG TCATCCTGAA
721 TTTTTTGAGT CCAATCAACA AGCCAAACAA AAAATTCAAG AAGAATATTA CCGCCTATCA
781 GAAACCTTCA AAGGATTAAT TCAAGCCACG AAAGGCTTTA AAAAAGGTCA AATTATCACC
841 ATGGGGGCT ATACTGGTTT AGGAAAAAACC ACTTTTGTCT ACAACCTTTT AATAGACATT
901 TCAAAAACCA AACATCAAGA AACAAAACAAA CATCCAAATA TGTGGTATT TTCTTATGAA
961 ATGACCTTAG AAGAAAATTT AAGTCGTTTA TTAGCCACC AAACTCAAAT TCCTTTAGAT
1021 ATTATTTTATG ATAAAATTT TGAAGACTCA AACATCACAC AACACACCTA CACGGAAAGG
1081 ATGAAGACCG CAAAACAATT ATTCGCCAAC ATAAAATTTAT CATTAGTTA CGATAAAGGC
1141 AAAAAATTTG ATTACGTCAT TGATTTAGTT TATCGCCTCT ATTTGGAACA AAAAAATCGAA
1201 ATCATCGTCA TTGACCACCT TCAAATAACC AAATCGACTA ATCATTTAGA AAATGATCGA
1261 TTAGCCATTG ACG

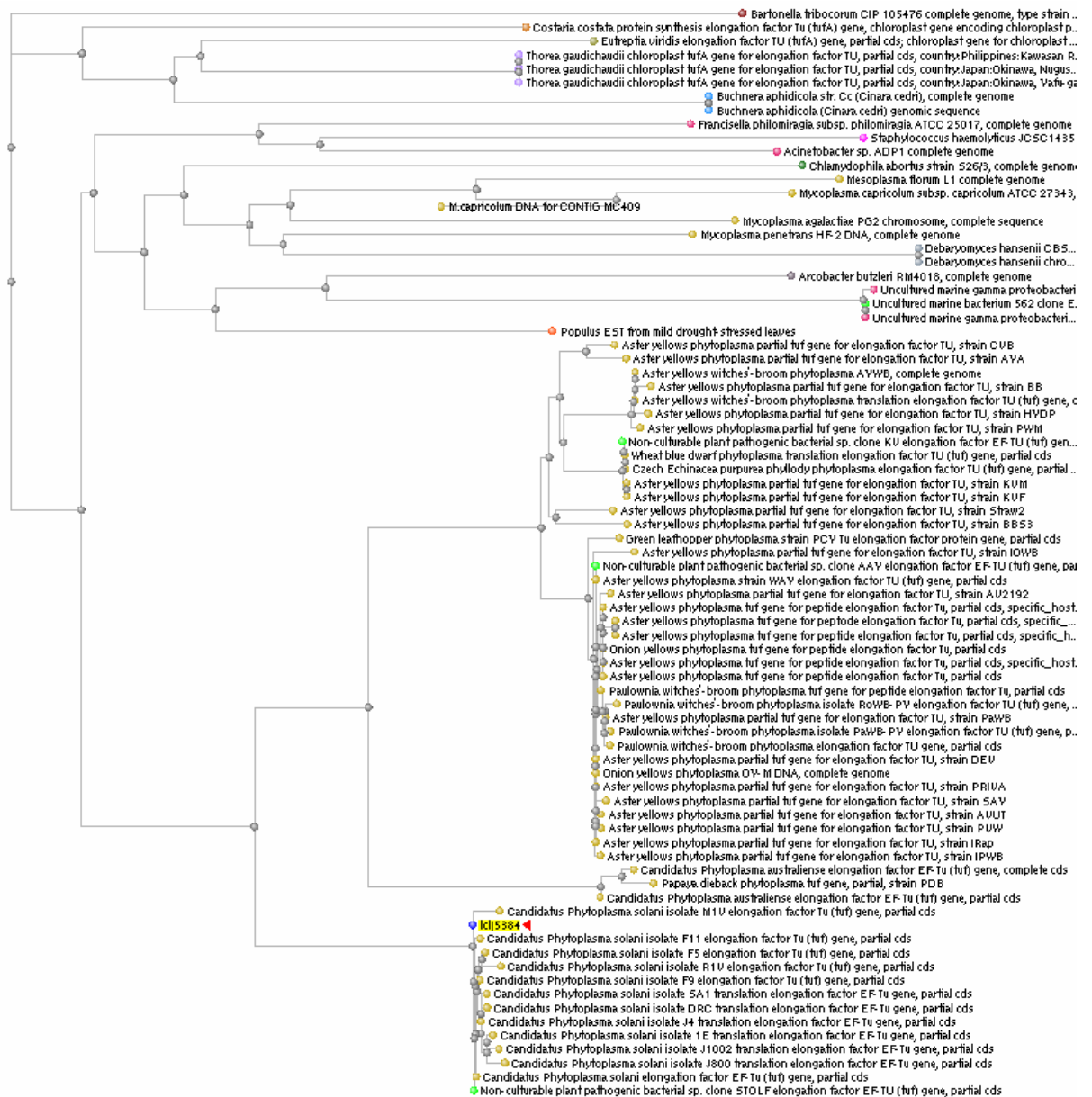
```

## 7.5. Fylogenetické stromy

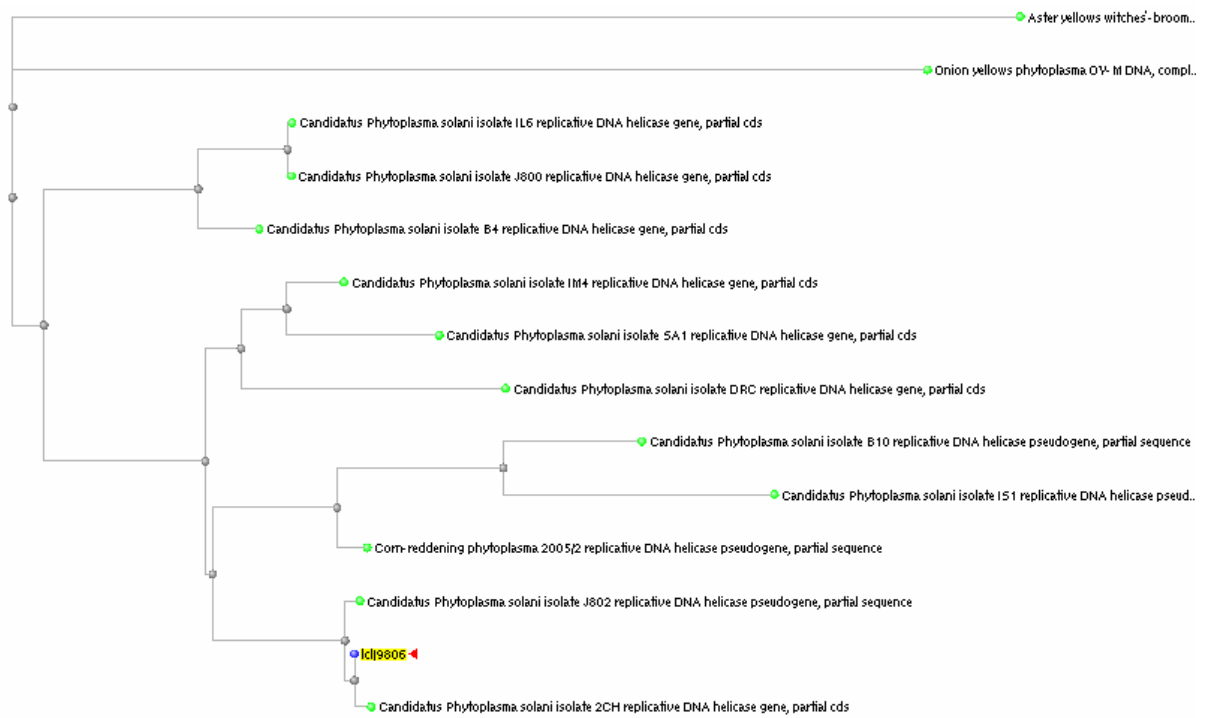
obr. 1: fylogenetická pozice srovnáním sekvence 16S rDNA



obr. 2: fylogenetická pozice srovnáním sekvenční pro Tuf gen



### obr. 3: fylogenetická pozice srovnáním sekvence genu pro DNA helikázu



## 7.6. Symptomy

obr.: 1



obr.:2



## 7.7. Abstrakt

### Phytoplasmas infecting Clover and Lucerne breeding Material in the Czech Republic

J. Fránová<sup>1</sup>, H. Jakešová<sup>2</sup>, P. Koloušková<sup>1,3</sup>, and K. Petrzik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Virology, Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre Acad. Sci. Czech Rep., v.v.i., Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup> Breeding firm Ing. Hana Jakešová, CSc., Fulnecká 100, 742 47 Hladké Životice, Czech Republic

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

#### Abstract

Investigation of phytoplasma diseases of forage crop has been started at the Department of Plant Virology, IPMB, approximately 10 years ago. Since 2007 more intensive screening was stimulated as new breeding nurseries were established during 2007 and older ones are treated. Samples from *Trifolium pratense* L., *T. hybridum* L. 4<sup>n</sup>, *T. repens* L., *T. persicum* L., and *Medicago sativa* L. plants originating from nurseries located at different regions of the Czech Republic were examined by TEM and tested by molecular methods for phytoplasma presence. Total DNA was extracted from 2 g of each plant. For preliminary phytoplasma diagnosis, DNA extract were amplified with the universal ribosomal primers P1/P7 followed by nested-PCR with primers F2n/R2. Amplification reactions and cycling conditions were programmed as previously described (Lee et al., 2004). DNA of PCR amplicons were separately digested with restriction enzymes. Amplified DNA fragments were sequenced and the sequences were compared with those available in the GenBank. Phytoplasmas detected during 2007 and 2008 screening are almost the same as that identified in wild growing clovers as well as in breeding material of red clover cultivated on single locality in North Moravia (Hladké Životice) during previous years (Fránová et al., 2004). We confirmed the occurrence of phytoplasmas belonging to 16SrI-B, 16SrI-C, and 16SrX-A ribosomal subgroups in several plants of red clover. However, we did not find phytoplasmas of 16SrIII-B ribosomal subgroup in the breeding material although it was reported on alsike and red clover previously. Furthermore, isolates of stolbur phytoplasma (16SrXII-A) founded in previously (Fránová et al., 2006), were thoroughly characterized. Analyses with ribosomal and non-ribosomal primer pairs (for 16S-23S ribosomal RNA gene, Tuf gene and putative helicase gene) were always in agreement, and confirm infection with stolbur phytoplasma VK-Type II (Langer and Maixner, 2004) in red clover samples.

This work was funded by research grants from the Ministry of Agriculture no. QH71145 and GA ASCR no. AV0Z50510513. The authors are deeply indebted to Mrs J. Rakouská and Mrs. O. Šonková for their technical assistance.

#### References

- Fránová J., Paltrinieri S., Botti S., Šimková M. and Bertaccini A. (2004). *Folia Microbiol.* 49(5), 617- 624.
- Fránová J., Petrzik K., Paltrinieri S., Botti S., Šimková M., Jakešová H. and Bertaccini A. (2006) In: Book of Abstracts. XVII. *Czech and Slovak Plant Protection Conference*. Prague 12 – 14 th September 2006, Czech Republic: 165-166.
- Langer M. and Maixner M. (2004). *Vitis* 43(4), 191- 199.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bottner K. D., Marcone C. and Seemuller E. (2004). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1037- 1048.

#### Presenting author information

Jana Fránová, Department of Plant Virology, Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre Acad. Sci. Czech Rep., v.v.i., Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice, Czech Republic  
Phone: +420 38 777 ext. 5535, Fax: +420 38 53 10 356, E-mail: jana@umbr.cas.cz

#### Preferred type of presentation (please indicate)

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Oral   |
| <input type="checkbox"/>            | Poster |