

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Molekulární charakteristika fytoplazmy infikující  
zahradní petrklíč (*Primula acaulis*)**

Bakalářská práce

**Kateřina Podrábská**

Školitelka: Dr. Ing. Jana Fránová

České Budějovice 2014

Podrábská, K., 2014: Molekulární charakteristika fytoplazmy infikující zahradní petrklíč (*Primula acaulis*). [Molecular analysis of the phytoplasma infecting *Primula acaulis*. Bc. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Phytoplasmas are the obligate intracellular wall-less bacteria infecting phloem of plants and are transmitted by the vectors from the class of *Mollicutes*. They are economically important pathogens causing crop worldwide losses. The phytoplasma infecting *Primula acaulis* was detected and characterized by molecular methods in this thesis. The highly conserved 16S-23S ribosomal operon and more variable genes *rplO* – *map*, *rps19* – *rps3*, *cpn60*, *tuf*, *pyrH* – *frr*, *hflB* were amplified, sequenced and analyzed. Additional molecular characteristic of 16S rDNA was carried out by the restriction fragment length polymorphism.

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

V Českých Budějovicích, 25. 4. 2014

.....

**Kateřina Podrábská**

## **Poděkování:**

Především bych ráda poděkovala paní Dr. Ing. Janě Fránové za odborné vedení, velkou ochotu vždy pomoci, přívětivé jednání a trpělivost. Dále jsem velmi vděčná paní Janě Rakouské za cenné rady a trpělivost při zaučování v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla velmi poděkovat mé rodině za nezměrnou podporu, která mě vždy vedla kupředu ke splnění mých cílů.

## Obsah

1. Úvod	6
1.1. Cíl práce	8
2. Literární přehled	9
2.1. Klasifikace fytoplazem	9
2.2. Genom fytoplazem	10
2.3. Příznaky fytoplazmových onemocnění na rostlinách	12
2.4. Patogenicita fytoplazem a obrana rostlinných hostitelů	12
2.5. Molekulární charakteristika fytoplazem	15
2.6. Metody detekce fytoplazem	
2.7. Pohyb fytoplazem uvnitř rostlinných hostitelů	18
2.8. Epidemiologie fytoplazmových onemocnění	20
3. Materiál a metody	21
3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
3.1.1. Amplifikace ribozomálního operonu 16S – 23S	22
3.1.2. Amplifikace genu <i>tuf</i>	23
3.1.3. Amplifikace genu <i>cpn 60</i>	24
3.1.4. Amplifikace genového úseku <i>rps19</i> , <i>rpl22</i> , <i>rps3</i>	25
3.1.5. Amplifikace genového úseku <i>rplO</i> , <i>secY</i> , <i>adk</i> , <i>map</i>	25
3.1.6. Amplifikace genového úseku <i>pyrH</i> , <i>fir</i>	26
3.1.7. Amplifikace genu <i>hflB</i>	27
3.2. Délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP)	27
3.3. Sangerovo sekvenování	28
4. Výsledky	30
4.1. Polymerázová řetězová reakce, analýza délkových polymorfismů restrikčních fragmentů a sekvence různých genů	30
4.1.1. PCR, restrikční štěpení a sekvenování ribozomálního operonu 16S – 23S	30

4.1.2. PCR a sekvenování genu tuf	31
4.1.3. PCR a sekvenování genu cpn 60	31
4.1.4. PCR a sekvenování úseku genů rps19, rpl22, rps3	32
4.1.5. PCR a sekvenování úseku genů rplO, secY, adk, map	32
4.1.6. PCR a sekvenování úseku genů pyrH, fir	33
4.1.7. PCR a sekvenování genu hflB	34
5. Diskuze	35
6. Závěr	37
7. Seznam použité literatury	39
8. Přílohy	50

## 1. Úvod

Fytoplazmy, prokaryotické organismy, jsou významnými patogeny rostlin. Způsobují velké ekonomické ztráty v zemědělství a v rozvojových zemích mohou být jednou z příčin hladu a chudoby. Infikují více než 700 druhů rostlin zahrnujících hospodářsky významné plodiny, ovocné stromy, okrasné rostliny, zeleninu i planě rostoucí vegetaci (Bertaccini, 2007). Jedná se o poměrně málo probádané organismy, u kterých probíhá intenzivní výzkum za účelem jejich kontroly. Vypuknutí epidemie je nežádoucí a fatální, po napadení rostlin a projevu symptomů systémové infekce většinou není možné rostlinu zachránit, pokud není rezistentní či tolerantní vůči fytoplazmám. Například v minulosti zasáhly do života mnoha lidí v Africe a Karibské oblasti epidemie fytoplazem na kokosových palmách. Přičemž místní obyvatelstvo je závislé na této rostlině z hlediska výživy i finančních příjmů. Propuknutí epidemie v roce 2001 na jabloních způsobilo škody za 100 milionů euro (Strauss, 2009). S globálním oteplováním se očekává zvýšený výskyt onemocnění způsobených fytoplazmami, vzhledem k citlivosti některých vektorů na chlad (Hogenhout *et al.*, 2008). Vzhledem k těmto faktům by zemědělci neměli podceňovat prevenci, která je jediným účinným prostředkem v boji proti fytoplazmám.

Rostlinná fytopatologie se vyvíjela po staletí a její rozvoj závisel na významných objevech. Sestrojení mikroskopu či ustanovení Kochových postulátů významně ovlivnilo mnoho oblastí vědy a znamenalo též velký pokrok i ve fytopatologii. Již v roce 1743 byla v Anglii Needhamem objevena mezi abnormálně kulatými zrny pšenice háďátka, avšak spojitost s chorobou byla potvrzena až později. Roku 1867 prokázal Woronin spojitost mezi nádory vzniklými na kořeni kapusty a houbou řazenou do Protozoí kmene Plasmodiomycota *Plasmodiophora brassicae* (nádorovka kapustová). Roku 1878 prokázal Burril spojitost infekce způsobenou bakterií *Erwinia amylovora* se symptomy spály růžovitých na hrušních a jabloních. Na počátku devadesátých let 19. století byla americkým vědcem Erwinem Smithem objeven patogen *Agrobacterium tumefaciens*, vytvářející nádory na rostlinných pletivech. V době, kdy probíhaly další objevy houbových a bakteriálních rostlinných patogenů, holandský vědec Adolf Mayer, v roce 1886 přenesl šťávu z tabáku vykazujícího žluto-zelenou mozaiku na zdravý tabák a pozoroval u něj projevy stejných symptomů. Z počátku byly za původce tohoto onemocnění považovány bakterie, jelikož přítomnost houbových organismů se neprokázala. Následně uvažoval Ivanowski o patogenicitě bakteriálních toxinů či velmi malých bakterií, které by prošly póry filtru. Roku 1898

Beijerinck vyvrátil přítomnost mikroorganismu a za původce onemocnění považoval tzv. infekční tekutinu, kterou nazval virem. Až do roku 1935 nikdo nevěděl, co virus je a jak vlastně vypadá. V tomto roce byly detekované Stanleyem proteiny ze šťávy nemocného tabáku. Rok poté Bawden s kolegy prokázal také přítomnost malého množství nukleové kyseliny (RNA) ve šťávě nemocného tabáku. V roce 1939 byl poprvé pozorován virus v elektronovém mikroskopu Kauschem a jeho kolegy. Gierrer a Schramm v roce 1956 odstranili obalový protein viru a zjistili, že příčinou infekce zajišťující také reprodukci je nukleová kyselina. V roce 1963 byla potvrzena flageláta jako původci choroby kávovníku projevující se deformacemi floému a vadnutím listů. V roce 1976 byla tato Protozoa označena jako původci chorob kokosových palm v Africe a Jižní Americe. Až do roku 1967 byly příznaky rostlin, žloutnutí, červenání, metlovitost stonků či proliferace vrcholů přisuzovány právě virům, přestože žádné nebyly identifikované. V tomto roce byly v Japonsku pozorovány v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) Doiem a jeho kolegy organismy podobné mykoplazmám (MLOs) u rostliny vykazující metlovitost stonků (Agrios, 1997). V roce 1994 byly tyto organismy na desátém kongresu Mezinárodní organizace mykoplazmologie nazvány fytoplazmami. V roce 2004 byl vytvořen nový rod '*Candidatus Phytoplasma*' (The IRPCM, 2004).

Fytoplazmy jsou vnitrobuněční obligátní parazité rostlin. Nacházejí se ve floému, ojedinele v přilehlých parenchymatických buňkách. Jedná se o bakterie monofyletického taxonu ze třídy Mollicutes, fylogeneticky příbuzné Gram-pozitivním bakteriím s nízkým obsahem G+C (Weisburg *et al.*, 1989; Lee *et al.* 2000). Jejich přenašeči a současně hostitelskými organismy je bodavě savý hmyz z řádu Hemiptera – křísy, mery, plošnice (Christensen *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008). Fytoplazmy jsou organismy většinou pleomorfní či sférické o velikosti 80 – 800 nm bez buněčné stěny, obklopené pouze cytoplazmatickou membránou (Doi *et al.*, 1967). Jsou všeobecně považované za bakterie nekultivovatelné *in-vitro*, proto byl pro ně zaveden provizorní taxon '*Candidatus Phytoplasma*' (IRCPM, 2004). Detekce a identifikace fytoplazem je založena na PCR amplifikaci a sekvenování 16S rDNA (The IRPCM, 2004). K citlivějšímu stanovení a pro zařazení do skupin a podskupin se používají méně konzervované sekvence. Genom fytoplazem je velmi redukovaný, ztratil většinu metabolických genů a zachoval si jen ty pro nejzákladnější funkce (Kakizawa *et al.*, 2001; Jung *et al.* 2003). Obsahuje četné potenciální mobilní elementy (Bai *et al.*, 2006). Přestože jsou fytoplazmy závislé na příjmu živin z hostitelských buněk, jejich patogenicita není založena na úbytku živin z floému. Byly u nich objeveny tzv. efektorové proteiny, které ovlivňují expresi rostlinných genů pro syntézu

hormonů, vývojových genů a mohou také ovlivnit obranné reakce hostitelského organismu (Hogenhout *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2009; Hogenhout & Music, 2010). V současné době je detekce fytoplazem založená především na molekulárních metodách. Teprve s rozvojem těchto metod vznikla věrohodná klasifikace. Velmi důležité zůstávají serologické metody, biologické testy, TEM a zhodnocení příznaků, které nás prvotně upozorní na přítomnost fytoplazem. Typické příznaky nákazy fytoplazmami jsou virescence, fylodie, metlovitost stonků, zvětšené pupeny, zkrácená internodia a další (Hoghenhout *et al.*, 2008).

Předkládaná práce je zaměřena na praktickou část. Cílem výzkumu bylo zjistit, která fytoplazma infikuje prvosenku v ČR a detailně ji charakterizovat. Jelikož jsou v současné době známy dva druhy fytoplazem (čtyři různé kmeny) izolované z prvosenky v Německu a Velké Británii, zajímalo nás, zda se u české prvosenky nenachází jiný druh. V případě identifikace stejného druhu nás zajímala variabilita různých genů. K molekulární detekci analyzované fytoplazmy jsem využila metod PCR, PCR nested, RFLP a Sangerovo sekvenování. K identifikaci fytoplazmy byl pro amplifikaci a následné sekvenování primárně zvolen velmi konzervativní genový úsek 16S – 23S rDNA a poté méně konzervované úseky rplO – map, rps19 – rps3, cpn60, tuf, pyrH, frf a hflB. Získané sekvence jsem upravovala a porovnávala se známými sekvencemi uloženými v databázi GenBank programem Blast.

### **1.1. Cíl práce**

Cílem této práce bylo identifikovat pomocí molekulárních metod, který druh fytoplazmy infikoval petrklíč zahradní (*Primula acaulis*) v ČR vykazující symptomy specifické pro fytoplazmová onemocnění. Dalším cílem byla detailní genetická charakterizace studované fytoplazmy.



## 2. Literární přehled

### 2.1. Klasifikace fytoplazem

Před rozvojem molekulárních metod byly fytoplazmy klasifikovány zejména podle biologických vlastností. Výsledky takovýchto výzkumů nebyly vždy jednoznačné a pokusy byly časově i finančně náročné. S objevením metody PCR a rozvojem dalších molekulárních metod se klasifikace fytoplazem značně zjednodušila a zpřesnila. V současné době se ke klasifikaci fytoplazem využívá metody PCR, sekvenování a RFLP především úseku 16S rDNA, který je vysoce konzervovaný. Na základě RFLP analýzy tohoto úseku bylo rozlišeno 14 skupin a 41 podskupin fytoplazem (Lee *et al.*, 1998). Dále se ke klasifikaci a molekulární charakterizaci využívá úseku 16S – 23S rDNA genového spaceru (Kirkpatrick *et al.*, 1994), úseku 23S rDNA, ribozomálních proteinů (Jomantiene *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1998), transkripčního faktoru Tu (Schneider *et al.*, 1997) s následným RFLP (Schneider *et al.*, 1993, 1997, Vibio *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 1998). Avšak stále důležitým pomocným faktorem k molekulárním metodám zůstávají biologické vlastnosti fytoplazem (Tsai, 1979, Shiomi & Sugiura, 1984, Kirkpatrick, 1992). The IRPCM (International Research Programme for Comparative Mycoplasmaology) Phytoplasma/Spiroplasma pracovní tým ustanovil pravidla pro vytvoření nového druhu. Podobnost sekvence 16S rDNA zkoumané fytoplazmy se sekvencí nejpodobnější fytoplazmy musí být menší než 97,5% a délka amplifikované sekvence 16SrDNA musí být větší než 1200 bazí. Existují ovšem i výjimky, kdy je ustanoven nový druh, i přesto, že sdílí s nejpodobnějším druhem více jak 97,5% shodnou sekvenci 16S rDNA. Děje se tak v případě populací fytoplazem, které jsou ekologicky izolované a mají odlišně biologické vlastnosti, fytopatologické a molekulární charakteristiky od nejpříbuznější fytoplazmy (The IRPCM, 2004). V současné době je kompletně osekvenovaný genom čtyř fytoplazem: ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’, strain Onion Yellow M (OY-M) (Oshima *et al.*, 2004), podskupina 16SrIB; ‘*Ca. P. asteris*’, strain Aster yellows witches’-broom (AY-WB) (Bai *et al.*, 2006), podskupina 16SrIA; ‘*Ca. P. australiense*’ (Tran-Nguyen *et al.*, 2008), skupina 16SrXII; ‘*Ca. P. mali*’ (Kube *et al.*, 2008), skupina 16SrX. Na základě sekvenční analýzy 16S rDNA byly fytoplazmy rozlišeny do tří fylogenetických klastrů. První klastr zahrnuje skupinu 16SrI (Aster Yellows group) a skupinu 16SrXII, zahrnující fytoplazmu stolbur (Stolbur group). Druhý klastr obsahuje skupinu 16SrX, zahrnující fytoplazmy skupiny proliferace jabloní (Apple proliferation group). Třetí klastr zahrnuje velké množství fytoplazem, z kterých jsou významné skupiny

16SrIII (Western X group), 16SrIV (Lethal yellowing group) a 16SrV (Elm Yellows group) (Hogenhout *et al.*, 2008). Osekvenování čtyř fytoplazem a porovnání jejich celých genomů přineslo významné informace o diverzitě na molekulární úrovni mezi skupinami, podskupinami a klastry fytoplazem (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006).

## 2.2. Genom fytoplazem

Fytoplazmy jsou organismy s malým genomem pohybující se v rozmezí od 602 kb ('*Ca. P. mali*') do 879 kb ('*Ca. P. australiense*') s vysokým obsahem bazí AT, 21,4 – 27,7% genomu tvoří guanin a cytosin. *Ca. P. mali* obsahuje lineární chromozóm, zatímco zbylé tři osekvenované fytoplazmy mají kruhový chromozóm (Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2004). '*Ca. Phytoplasma asteris*' OY – M má velikost genomu 861 kb (Oshima *et al.*, 2004), zatímco '*Ca. Phytoplasma asteris*' AY – WB 707 kb (Bai *et al.*, 2006). Genom fytoplazem je tvořen 500 – 840 geny, z nichž až 50% kódují proteiny s dosud neznámou funkcí, tzv. hypotetické proteiny (Abramovitch *et al.*, 2006; Jones & Dangl, 2006). Velmi nápadným společným rysem všech fytoplazem je rozsáhlá redukce genů kódujících mnoho metabolických drah. Typickým znakem fytoplazem je ztráta genu kódujícího F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> typ ATP syntázy, který je přítomný u ostatních bakterií, tedy i u příbuzných mykoplazem (Razin *et al.*, 1998). Dokládají to výsledky analýz čtyř osekvenovaných genomů fytoplazem (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2008). Předpokládá se, že membránový potenciál zajišťuje pět genů kódujících P typ ATP syntáz, které jsou podobné Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> živočišným pumpám (Bai *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2005). Fytoplazmy jsou zřejmě velmi závislé na tvorbě ATP v procesu glykolýzy. Tomu odpovídají i výsledky analýzy 30 kb dlouhého osekvenovaného úseku AY-W, který obsahuje duplikované geny kódující glykolytické enzymy (Oshima *et al.*, 2007). '*Ca. P. mali*' postrádá všechny geny pro glykolýzu, pyruvát je tedy vytvářen mimo tento proces (Kube *et al.*, 2012). Mezi redukované metabolické dráhy patří pentózový cyklus, močovinový cyklus a dráhy vedoucí k syntéze mnoha aminokyselin (phenylalanin, d-glutamin, d-glutamát, d-arginin, d-ornithin, d-alanin a d-glutathion) (Tran-Nguyen *et al.*, 2008). Fytoplazmy tedy spoléhají na své rostlinné a hmyzí hostitele v přísunu základních metabolitů. Tomu odpovídá i přítomnost mnoha genů kódujících různé transportní systémy. Patří mezi ně permeázy a ABC transportní systém zajišťující přísun oligopeptidů, dipeptidů, d-methioninu, maltózy, sacharózy, trehalózy, anorganických iontů (Mn, Cn a Zn) a dalších

důležitých látek (Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008). Všechny čtyři osekvenované fytoplazmy obsahují ve svém genomu důležitý gen *sodA*, který kóduje Mn-SOD (superoxid dismutázu), enzym, který inaktivuje reaktivní formy kyslíku, které produkují rostliny při napadení patogeny (Miura *et al.*, 2012). Společným znakem '*Ca. Phytoplasma asteris*' a '*Ca. P. australiense*' jsou mnohačetné opakující se kódující sekvence. Většina z nich jsou uspořádané v klastrech nazvaných potenciální mobilní elementy (PMUs). U AY – WB byl identifikován PMU nazvaný PMU 1 dlouhý 20 kb s 21 otevřenými čtecími rámci (ORF). PMU 1 je ohraničen na obou koncích sekvencí kódující transponázu (*tra5*), z jedné strany je však sekvence neúplná. Tato transponáza zajišťuje transpozici pravděpodobně replikativním způsobem. PMU1 je také z obou stran ohraničen úsekem invertovaných repetitivních sekvencí dlouhým 327 bp (Bai *et al.*, 2006, 2009). Transpozice mezi lineárním chromozómem a plasmidem byla potvrzena u '*Ca. P. asteris*' AY – WB (Toruno *et al.*, 2010). V oblasti PMUs se nacházejí geny pro rekombinaci (*HimA*), replikaci DNA (*ssb*, *dnaB*, *dnaG*), syntézu (*tmk*), transkripční faktor (*sigF*) a mnoho genů kódujících membránové proteiny (např. *hflB* – ATP-dependenční Zn proteáza) či proteiny určené k sekreci (Bai *et al.*, 2006, 2009). Fytoplazmy AY–WB a OY- M většinou obsahují další kratší PMU než PMU1 se zkrácenými geny (potenciálními pseudogeny) (Bai *et al.*, 2006). '*Ca. Phytoplasma australiense*' obsahuje také mnohočetné kopie PMUs se pseudogeny (Tran-Nguyen *et al.*, 2008). '*Ca. P. mali*' obsahuje podobnou PMU s PMU1 fytoplazmy AY–WB, avšak schází jí kompletní sekvence pro transponázu (Kube *et al.*, 2008). '*Ca. Phytoplasma asteris*' AY–WB a OY-M mají v genomu nepravidelně rozmístěné báze GC, což zajišťuje jejich genomovou plasticitu. (Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008), zatímco '*Ca. P. mali*' má vzhledem k pravidelnému rozmístění GC stabilní genom (Kube *et al.*, 2008). Vzhledem k zúženému okruhu hostitelů '*Ca. Phytoplasma mali*' [rostlinným hostitelem je jabloň a vektorem oligofágní mery (Mayer *et al.*, 2009)] má tato fytoplazma daleko menší pravděpodobnost výměny genetické informace s ostatními organismy na rozdíl od '*Ca. P. asteris*' a '*Ca. P. australiense*', které jsou přenášeny polyfágními vektory na široký okruh hostitelských rostlin (Hogenhout *et al.*, 2008). Pravděpodobně z tohoto důvodu má '*Ca. P. mali*' nejredukovanější genom s nejméně mobilními elementy a žádnou extrachromozomální DNA v porovnání se třemi osekvenovanými fytoplazmami (Sugio & Hogenhout, 2012). U '*Ca. P. asteris*' AY–WB a OY-M a '*Ca. P. australiense*' byla prokázána extrachromozomální DNA. Každý plasmid při tom nese *rpp* a *sbb* gen zajišťující replikaci a neznámé geny, z nichž u některých je předpokládána lokalizace v cytoplazmatické membráně (Bai *et al.*, 2006). U plasmidů fytoplazem byla prokázána rekombinace mezi chromozómem a plasmidem (Bai *et al.*, 2006)

a mezi jednotlivými plazmidy dvou fytoplazem, což velmi přispívá k jejich diverzitě (Nishigawa *et al.*, 2002; Liefting *et al.*, 2004). U fytoplazem je velmi pozoruhodné přizpůsobení se tak odlišným hostitelským prostředím jako jsou rostlinné a živočišné buňky. Mikročipy odhalily u '*Ca. P. asteris*' OY-M až 33% proteinů, které změnilly svou expresi v rostlinném hostiteli a vektoru (Oshima *et al.*, 2011). Například u '*Ca. P. asteris*' AY – WB byla prokázána větší exprese genů zabudovaných v PMU uvnitř hmyzích buněk než v rostlinných (Toruno *et al.*, 2010). V případě '*Ca. P. asteris*' OY-M je TENGU protein exprimován ve větší míře uvnitř rostlinného hostitele (Hoshi *et al.*, 2009). Avšak mechanismus rozpoznání odlišného prostředí je dosud neznámý.

### **2.3. Příznaky rostlin**

Příznaky rostlin se objevují jako reakce na vzniklou infekci. Mohou se lišit v souvislosti s rozdílnou reakcí rostlin na stejného patogena, různí se také s infekcí odlišných fytoplazem, stářím rostliny v době infekce a jsou ovlivněny také vnějšími podmínkami (McCoy, 1979; McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Seemüller *et al.*, 2002). Typické symptomy způsobené fytoplazmami jsou následující: virescence (zelené zbarvení květů), fylodie (okvětní orgány přeměněné v listy), metlovitost výhonů, květní abnormality vedoucí ke květní sterilitě, velké pupeny, zkracování a prodlužování internodií a zvětšené palisty. Méně specifické je žloutnutí či červenání listů, svinování listů, zmenšení plodů, předčasný opad listů, zakrsnutost, odumírání dřevin od vrcholu (Hoghenhout *et al.*, 2008). Nakažená rostlina nemusí vykazovat žádné příznaky, a přesto může být infekční, tomuto jevu říkáme latentní onemocnění. U některých rostlin může také docházet k remisi příznaků (Marcone., 2010). Jako indikátorová rostlina se používá barvínek růžový (*Catharanthus roseus*), jelikož vykazuje celou škálu symptomů při nákaze různými fytoplazmami. Je také dostatečně tolerantní k fytoplazmám, takže jim umožní přežít v rostlině ve vysokých koncentracích. Je tedy vhodnou rostlinou k uchovávání izolátů fytoplazem (Berges *et al.*, 2000).

### **2.4. Patogenicita fytoplazem a obrana rostlinných hostitelů**

Jelikož fytoplazmy žijí ve floému rostlin, nejvíce ovlivňují hostitelskou rostlinu snížením vodivé funkce sítkovic. K tomuto jevu dochází ukládáním kalózy v sítku sítkovic, které vedou až k nekróze floému (Musetti, 2010). Dochází tak k akumulaci karbohydrátů

v různých částech rostlin a celkovému zhoršení metabolických aktivit rostlin (McCoy, 1979; Leon *et al.*, 1996; Lepka *et al.*, 1999; Tan & Whitlow, 2001; Maust *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). Dále je inhibován transport aminokyselin, což vede ke zpomalení růstu a zakrslosti (Lepka *et al.*, 1999). Zhoršuje se propustnost průduchů, což ovlivňuje vodní režim rostliny a fotosyntézu. Celkově se zhoršuje funkce fotosyntetického aparátu a dochází k narušení toku hormonů a živin v souvislosti s degradací sítkovic (McCoy, 1979; Leon *et al.*, 1996; Lepka *et al.*, 1999; Tan & Whitlow, 2001; Maust *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). S ukládáním škrobu v chloroplastech souvisí rozklad chloroplastů (Musetti, 2010) a tvorba chloróz. Předpokládá se, že symptomy rostlin nejsou důsledkem spotřebovávání živin z floému fytoplazmami. Příbuzné prokaryotní organismy ze třídy Mollicutes, spiroplazmy, taktéž žijící ve floému rostlin, vykazují příznaky žloutnutí a zakrslost hostitelských rostlin, které se vyskytují taktéž u fytoplazem. Ačkoliv v případě spiroplazem jde o příznaky způsobené nerovnoměrnou koncentrací glukózy a fruktózy ve floému, u fytoplazem se za zdroj patogenicity uvažuje jiný faktor (Andre *et al.*, 2005). K této hypotéze taktéž přispívá fakt, že fytoplazmy způsobují u hostitelských rostlin rozmanité symptomy, které se u spiroplazem nevyskytují (Andre *et al.*, 2005). Jsou jimi například fylodie, virescence či metlovitost stonků. Za virulentní faktor je považována molekula zasahující do vývoje rostliny, tzv. efektorový (virulentní) protein (Hogenhout *et al.*, 2008; Bai *et al.*, 2009). Tyto proteiny ovlivňují vývoj rostliny ku prospěchu fytoplazem a jejich vektorů. Například zvětšováním plochy vegetativních částí rostlin a tedy i vytvářením nových cévních svazků se zlepšují podmínky pro sání vektorů a kladení jejich vajíček. Napadená rostlina může být také pro vektory atraktivnější než rostlina zdravá, je to pravděpodobně způsobeno vylučováním těkavých látek, hmyzích atraktantů (Mayer *et al.*, 2008 a, b). Efektorové proteiny mohou také ovlivnit vývoj květu (virescence, fylodie), syntézu hormonů a potlačit obranné reakce rostlin i hmyzu (Hogenhout & Music, 2010). Významným virulentním proteinem je SAP 11, prokázáný u '*Ca. P. asteris*' AY-WB, který obsahuje jadernou signalizaci (Bai *et al.*, 2009). SAP 11 způsobuje u rostlin zkroucení listů a metlovitost stonků a byl také prokázán pozitivní vliv na plodnost vektorů sajících na rostlinách s exprimovaným SAP 11 (Sugio *et al.*, 2011). Za další virulentní faktor se považují geny hlyC a flyC kódující hemolyziny, které zajišťují rozklad buněčné stěny. Dalším možným virulentním proteinem je ATP-dependentní Zn proteáza kódovaná genem hflB. Tento protein je zabudován v buněčné stěně fytoplazmy a pravděpodobně štěpí hostitelské proteiny na jednotlivé aminokyseliny, které pak využívají ve svůj prospěch. Další možnou funkcí je štěpení proteinů, které rostlina vytvoří v obranné reakci proti patogenu (Hogenhout *et al.*, 2008). Protein TENGU byl identifikován u '*Ca. P.*

asteris' OY-M a byl označen jako původce symptomů metlovitosti stonků a zakrsnutí rostlin (Hoshi *et al.*, 2009; Sugawara *et al.*, 2013). Pomocí metody mikročipů byla zjištěna snížená exprese genů pro syntézu auxinu v přítomnosti TENGU proteinu (Hoshi *et al.*, 2009; Denancé *et al.*, 2013). U rostlin, které jsou tolerantní k nákaze fytoplazmami, se uvažuje o důsledcích dlouhodobému vystavení toxických metabolitů některých fytoplazem. Příkladem takovýchto fytoplazem jsou: rice yellow dwarf, Australian papaya dieback, lethal yellows of coconut palms, Australian papaya dieback and rice yellow dwarf (Leon *et al.*, 1996; Siddique *et al.*, 1998; Guthrie *et al.*, 2001; Tan & Whitlow, 2001). Symptomy související se změnou koncentrace hormonů jsou například fylodie, předčasné otevírání pupenů či kvetení. Fytoplazmy především ovlivňují koncentraci auxinu (IAA). Pokus provedený na barvínku nakaženém fytoplazmou vykazoval až desetinásobnou koncentraci IAA oproti zdravé kontrole (Pertot *et al.*, 1998). Dalším hormonem důležitým v rostlinném vývoji je cytokinin, jehož zvýšená exprese pravděpodobně způsobuje u hostitelských rostlin fylodii (Kesumawati *et al.*, 2006) a virescenci, při které se akumuluje cytokinin ve vysokých koncentracích v květních částech rostlin (Davey *et al.*, 1981). Fytoplazmy dále ovlivňují syntézu expansinů, gibberelinů, kyseliny abscisové a ethylenu, jejichž syntéza je také zvýšená při infekci. Mezi geny ovlivňující vývoj rostlin patří *LeWUSCHEL*, *LeCLAVATA1* a *LeDEFICIENS*, jejichž exprese je snížena, zatímco gen *FALSIFLORA* je upregulován. Tento jev byl studován u rajčete nakaženého fytoplazmou stolburu, u kterého se vlivem regulace těchto genů vytvořily květní abnormality (Smart & Kirkpatrick 1996, He *et al.* 1998). Rostliny nakažené fytoplazmami zvyšují syntézu některých chemických látek jako nespecifickou obranu proti přítomnému patogenovi. Patří mezi ně například fenolické látky, polyaminy, alkaloidy a různé proteiny. S přítomností patogena souvisí zvýšené množství proteinů v cytoplazmě rostlinných buněk. Jedná se o proteiny syntetizované rostlinou jako obrana vůči patogenovi či různé virulentní proteiny patogena. Mezi rostlinné obranné proteiny patří tzv. PR proteiny (pathogenesis-related proteins) - *b*-1,3-glukanázy, peroxidázy a chitinázy. U některých rostlin bylo po odeznění příznaků způsobené fytoplazmami detekovaná nadprodukce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Musetti *et al.*, 2007). Fenolické látky se především nacházejí a akumulují u tolerantních rostlin a jsou toxické pro patogena (Agrios, 1997). Patří mezi ně například polyfenoly, kyselina chlorgenová a gallotanin (Bruni *et al.*, 2005). Při nákaze dochází také ke zvýšené syntéze alkaloidů a to především ajmalicinu, vindolinu, serpentinu, vinblastinu, vincristinu a serpentinu (Favali *et al.*, 2004).

Proti fytoplazmám je částečně účinný tetracyklin. Toto antibiotikum zabrzdí proteosyntézu navázáním se na 30S ribozomální podjednotku ribozómu. Není ale příliš

vhodné k použití, jelikož dochází u léčených rostlin k návratu symptomů (McCoy, 1982; Kaminska & Silwa, 2003). U některých rostlin bylo po několika letech pozorováno samovolné vymizení příznaků způsobené nákazou fytoplazmami (Osler *et al.*, 2003). Pokud se u rostliny do tří let znovu neobjeví příznaky, lze ji považovat za zdravou (Maixner, 2006).

## 2.5. Molekulární charakteristika fytoplazem

Pro vylučování efektorových proteinů ven z buňky potřebují fytoplazmy vlastní sekretorický aparát. U fytoplazmy '*Ca. P. asteris*' OY a AY-WB byl identifikován sekretorický systém (Sec system) známý u *E. coli* obsahující tři esenciální podjednotky tohoto systému SecA, SecY, SecE, bez kterých by bakterie nepřežila (Kakizawa *et al.*, 2001, 2004). Zatímco velmi dobře charakterizovaný Sec systém u *E. coli* se skládá přinejmenším z 11 proteinů a jednoho typu RNA (Economou, 1999), u '*Ca. P. asteris*' OY a AY-WB byl identifikován gen pro membránový protein YidC (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). Tento protein zprostředkovává zabudování ostatních proteinů do cytoplazmatické membrány a pomáhá jim v orientaci v lipidové dvojvrstvě (Serek *et al.*, 2004). Většina membránových proteinů se řadí mezi tzv. imunodominantní membránové proteiny (IDPs) (Shen & Lin, 1993), které jsou lokalizované na vnější straně cytoplazmatické membrány (Milne *et al.*, 1995). Proto jsou tyto proteiny používány k vytváření protilátek pro detekční serologické metody (Kakizawa *et al.*, 2010). Pravděpodobně se jedná o adheziny, které fytoplazmám umožňují přilnout k vnitřní straně cytoplazmatické membrány hostitele. V tomto ohledu se fytoplazmy velmi podobají mykoplazmám (Marccone & Ragozzino, 1996). IDPs rozlišujeme na tři odlišné typy: imunodominantní membránový protein (Imp), imunodominantní membránový protein A (idpA) a antigenní membránový protein (Amp). Amp asociuje s mikrofilamenty hmyzu a vytváří AM komplex a tím ovlivňuje přenos fytoplazem vektory a určuje tak specifitu fytoplazem ke hmyzím vektorům u OY fytoplazmy (Kakizawa *et al.* 2010, Suzuki *et al.*, 2006).

## 2.6. Metody detekce fytoplazem

Fytoplazmy můžeme detekovat mnoha metodami, molekulárními, serologickými, biologickými, vizuálně (symptomy) a transmisní elektronovou mikroskopií (TEM). Avšak výraznou překážkou v jejich detekci je jejich nerovnoměrné rozložení v rostlinách, nízká

koncentrace, především u dřevin, sezónní změny koncentrace a migrace fytoplazem mezi rostlinnými orgány (Firrao *et al.*, 2007). Proto byly pro molekulární metody navrženy vhodné protokoly pro zakoncentrování DNA a její získání v nejvyšší kvalitě. To znamená odstranění inhibičních látek, nejčastěji rostlinných fenolických látek a polysacharidů (především u dřevin), které by mohly narušit funkci DNA polymerázy (Marzachi *et al.*, 2004). Ve vektorech bývají fytoplazmy většinou ve vyšších koncentracích (Wally *et al.*, 2008).

Dnes jsou nejpoužívanějšími a nejpřesnějšími metodami metody molekulární. Z nichž se využívá především PCR a jeho různých modifikací (PCR direct, PCR nested, real-time PCR a další), s následnou analýzou délkového polymorfismu restrikčních fragmentů (RFLP) či sekvenování. Dříve se hojně používala molekulární hybridizace (dot blot hybridizace) (Clair *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1998; Schaff *et al.*, 1992) a dnes i hojně mikročipy. Ze serologických metod se využívá enzymová imunitní metoda ELISA a její různé modifikace (Brzin *et al.*, 2003). Dnes již méně používanou metodou je dvojitá difuze v agaru. Důležitou metodou zůstávají biologické testy, které jsou založené na přenosu fytoplazem na hostitelskou rostlinu. Patří mezi ně přenos roubováním, vektory či kokotici na barvínek růžový (Fránová, 2008). Vizuální stanovení fytoplazem podle přítomnosti specifických symptomů není zcela jednoznačné. Proto je nezbytné využít i další metody. Jelikož se velikost fytoplazem pohybuje v rozmezí 80 – 800 nm (Doi *et al.*, 1967), jsou pozorovatelné uvnitř sítkovic pouze v elektronovém mikroskopu. K detekci fytoplazem se také využívá rychlé metody fluorescenční mikroskopie, u které se vzorek barví DNA fluorochromem DAPI (4 -6- diamidino-2-fenylindol.2HCl) (Fránová, 2008).

Mezi molekulárními metodami je v současné době hojně používáno Real-time PCR. Vzhledem k tomu, že není potřeba produkt amplifikace nanášet na gel, celý proces detekce se urychlí. Metoda je velmi citlivá a zároveň umožňuje kvantitativní stanovení DNA (Galletto & Marzachě, 2010). Základem kvantitativního stanovení je exponenciální nárůst syntetizovaných vláken. Po 35 cyklech je nasyntetizovaných  $2^{36}$  molekul DNA. Pro detekci nasyntetizovaných molekul v každém cyklu se využívá interkalačního barviva, fluorescenčně značených sond či primerů (Šmarda *et al.*, 2005). U této metody se běžně používá SYBR<sup>®</sup> Green, který se váže do malého žlábků dvojřetězcové DNA. V každém cyklu se s množstvím amplifikované DNA zvyšuje množství fluorescence SYBR<sup>®</sup> Green. Problémem při použití této fluorescenční látky je její nespecifické navázání na DNA. Pro specifické navázání se používají sondy TaqMan<sup>™</sup>, které mají na 5' konci navázanou fluorescenční molekulu a na 3' konci zhášec. Po vyštěpení části próby s fluorescenční



značkou 5' exonukleázovou aktivitou Taq DNA-polymerázy, dochází k fluorescenci, která je detekovaná speciálním termocyclerem se schopností detekce fluorescence (Šmarda *et al.*, 2005). Existuje mnoho dalších metod pro detekci produktů real-time PCR, avšak nejčastěji se k detekci fytoplazem využívají tyto dvě metody.

U rostlin se velmi často vyskytují směsné infekce patogenů. Například u pšenice jsou často identifikovány čtyři druhy virů za přítomnosti fytoplazmy (Tao *et al.*, 2012). K molekulárnímu stanovení takových infekcí je vhodné použít multiplex PCR. Důležitým předpokladem je navržení primerů na konzervované úseky DNA v genomu domnělých patogenů způsobujících infekci. Jejich annealingová teplota musí být totožná. Společné reakční prostředí pro jednotlivé reakce musí být řádně optimalizované. Výhodou této metody je úspora času a financí (Tao *et al.*, 2012).

Hojně používanou serologickou metodou je ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), jejíž výhodou je zpracování velkého množství vzorků najednou a možná automatizace. Vysoce specifickou modifikací je DAS (Double-Antibody-Sandwich) – ELISA (Bos, 1999). Pro detekci fytoplazem se však využívají i její modifikace. Jak již z názvu vyplývá, jedná se o imunno-enzymatickou reakci, jejíž jednotlivé kroky na sebe řetězově navazují. Hlavní komponent reakce, protilátky vytvořené imunizací savčího imunitního systému – imunoglobuliny (produkty B-lymfocytů), mají schopnost vázat se na povrch plastové či polyvinilové destičky (Bos, 1999). Právě navázání imunoglobulinů na povrch této mikrotitrační destičky je prvním a zásadním krokem. Následuje napipetování vzorku a znovu protilátky, která je konjugovaná s enzymem. V případě přítomnosti dané fytoplazmy vznikne komplex protilátka-antigen-protilátka, tzv. sandwich. Enzym připojen k druhé přidané protilátce bývá nejčastěji křenová peroxidáza či alkalická fosfatáza. Posledním krokem metody je přidání substrátu (p – nitrofenylfosfát pro alkalickou fosfatázu), který spustí enzymatickou reakci vedoucí k barevné změně, která je pouhým okem viditelná a dále se analyzuje pomocí spektrofotometru (Bos, 1999).

Další hojně používanou a vhodnou metodou k detekci fytoplazem jsou mikročipy. Základem této metody je molekulární hybridizace. Ačkoliv se po rozvoji PCR dostaly metody založené na tomto principu do ústraní, mikročipy nyní zajišťují rychlou a spolehlivou detekci fytoplazem. Jedná se o metodu, při které se tisíce prób přichytí k pevnému podkladu. Hybridizující sekvence jsou značené fluorescenční barvou, aby bylo možné detekovat jejich přítomnost (Rinaldis, 2005).

## 2.7. Pohyb fytoplazem uvnitř hostitelů

Jak bylo dříve řečeno, fytoplazmy osidlují dva druhy hostitelů - rostliny a hmyzí vektory. Hmyzem jsou přenášeny propagativně, cirkulativně, perzistentně a ojediněle transovariálně (Alma *et al.*, 1997). Dostávají se do těla hmyzího hostitele přes stylety, kterými je nasáván obsah floému rostlin i s přítomnými fytoplazmami. Fytoplazmy pak doputují do střeva vektora a po překonání jeho epitelální vrstvy vstoupí do střevních buněk a replikují se. Ze střeva dále putují do hemolymfy a taktéž se replikují (Purcell *et al.*, 1981). Podmínkou pro přenos fytoplazem a infekčnost hmyzu je jejich přítomnost a replikace ve slinných žlázách (Fialová, 2008). Doba sání vektora potřebná k příjmu dostatečného množství fytoplazem se nazývá akviziční doba sání (AAP - acquisition access period), která se odehrává v rozmezí pár minut až několik hodin (Purcell, 1982). Inkubační doba, doba kdy fytoplazma projde tkáněmi hmyzu a dostatečně se namnoží, pravděpodobně trvá od 10 – 21 dnů. Latentní perioda je doba, která uplyne od počátečního nasátí fytoplazem z floému do konečného namnožení fytoplazem ve slinných žlázách, kdy je schopen vektor jejich přenosu (Weintraub & Beanland, 2006). Délka latentní periody je záležitostí interakce mezi vektorem a fytoplazmou. Pokud jsou tedy různé druhy vektorů napadené stejnou fytoplazmou, pravděpodobně budou délky latentních period odlišné. Například chrysanthemum yellows fytoplazma je přenositelná po osmnácti dnech u vektora *Macrostele quadripunctulatus*, zatímco za 30 dní u *Euscelidius variegatus* (Bosco *et al.*, 2007). Vztah fytoplazem ke hmyzu z řádu Hemiptera není zcela jasný, v některých případech se jedná o parazitismus (Madden *et al.*, 1995), některé fytoplazmy jsou pro ně prospěšné, jak bylo prokázáno u samiček křísa *Macrosteles quadrilineatus* nakažených fytoplazmou ze skupiny žloutenky aster (Beanland *et al.*, 2000), u jiných druhů nebyl pozorován žádný vliv. Vektor může sáním z jediného druhu rostliny či z několika druhů, v případě polyfágního vektora, získat více druhů fytoplazem, které společně mohou interagovat. Směsné infekce jsou často detekovány v hmyzích vektorech i v rostlinách. Dochází také ke směsným infekcím fytoplazem se spiroplazmami a fytoplazem s viry, u kterých byla prokázána interakce. Například u *Macrosteles quadrilineatus* nakaženého fytoplazmou aster yellows a virem oat blue dwarf virus byla prokázána interakce snížením přenosu obou patogenů (Hsu & Banttari, 1979). U vektora *Dalbulus maidis* byla prokázána interakce fytoplazmy maize bushy stunt phytoplasma se spiroplazmou corn stunt spiroplasma. Patogen s vyšší virulencí, v tomto případě spiroplazma, postupně inhibuje přenos fytoplazmy. Při prvním sání dochází k přenosu obou fytoplazem a později se přenáší jen agresivnější patogen. Předpokládá se, že

jak v rostlinném hostiteli, tak ve vektorovi dochází ke kompetici o hostitelskou tkáň, kterou vyhraje rychleji se replikující patogen (Maramorosch, 1958).

Pohyb fytoplazem uvnitř rostlinných hostitelů, jejich koncentrace a individuální reakce rostlin významně ovlivňují projevy nákazy u rostlin. Po penetraci sítkovic floému stylety hmyzu dochází k nauce rostliny. Fytoplazmy se pohybují v toku asimilátů směrem z infikovaného pletiva do kořene a pak do vrcholových částí rostlin, až do květů. Nejvyšší koncentrace fytoplazem je dosaženo právě ve vrcholových částech rostlin s plně vyvinutými symptomy, poté v mladších listech a velmi málo ve zdrojových listech. Právě vrcholové části rostlin jsou největším zdrojem živin, proto právě zde dochází k akumulaci fytoplazem (Christensen *et al.*, 2004). U ‘Ca. Phytoplasma asteris’ OY byla pomocí metod real-time PCR a imunohistochemických technik na rostlině *Chrysanthemum coronarium* detekována dynamika fytoplazem. Z infikovaného listu se tato fytoplazma během jednoho dne dostala do stonku, dalším dnem osídlila kořeny a vrcholové části rostlin, zatímco migrace do spodních listů nastala po 7 – 21 dnech. Mezi 14 – 28 dnem infekce došlo k šestinásobnému zvýšení koncentrace fytoplazem v kořeni a listech, jak prokázala kvantitativní PCR (Wei *et al.*, 2004). Chování více či méně příbuzných fytoplazem v rostlinách se může značně odlišovat. Například dva kmene fytoplazmy ‘Ca. P. asteris’ SAY a DAY se liší v rychlosti kolonizace rostliny v čase. Kmen SAY je považován za agresivnější oproti kmenu DAY. Hostitelská rostlina (*Catharanthus roseus*) vykazuje příznaky systémové infekce u kmene SAY až o jeden týden dříve, což poukazuje na rychlejší migraci fytoplazem. Po čtyřech týdnech však dochází k významnému snížení koncentrace fytoplazem kmenu SAY, zatímco kmen DAY dále zvyšuje svou koncentraci (Kuske & Kirkpatrick, 1992). Pohyb fytoplazem v rostlinách je v mírném pásu ovlivněn ročním obdobím. U některých listnatých dřevin dochází na konci podzimu či na začátku zimy k degradaci sítkovic. Tyto fyziologické změny spolu s chováním fytoplazem byly pozorovány u hrušně a jabloně nakažené fytoplazmami ‘Ca. P. mali’ a ‘Ca. P. pyri’. Jelikož jsou fytoplazmy závislé na funkčním floému, migrují v tomto období z nadzemních částí rostlin do kořenů, kde přečkávají nepříznivé období. Po znovuvytvoření sítkovic se fytoplazmy přesunují zpět do nadzemních částí rostlin. Mechanismus pohybu fytoplazem není dosud zjištěn. Koncentrace fytoplazem je rozdílná u bylin a dřevin. Zatímco bylinní hostitelé umožňují fytoplazmám dosáhnout vyšších koncentrací, v dřevinách se většinou nacházejí v nižších koncentracích, které znesnadňují jejich detekci (Berges *et al.*, 2000). Byliny s vysokou koncentrací fytoplazem používané jako indikátorové rostliny jsou především barvínek růžový (*Catharanthus roseus*), dále celer, tabák, salát, brukev a další (Berges *et al.*, 2000). Existují i dřevinní hostitelé, u kterých se fytoplazmy vyskytují ve

vyšších koncentracích. U těchto hostitelů je možný odlišný mechanismus patogenicity. Avšak důležitým faktorem zůstává odlišná citlivost hostitele k fytoplazmám. Například u fytoplazmy proliferace jabloně byla zjištěna u hostitelů *Malus domestica*, *Malus silvestris* vysoká koncentrace těchto fytoplazem v souvislosti s nízkou citlivostí hostitele k nim. Sítkovice a množství škrobu se u těchto hostitelů příliš nelišilo od zdravých rostlin. Tito hostitelé tedy tvořili ideální podmínky pro život a množení fytoplazem. Zatímco například u *Malus kansuensis* a *Malus sargentii* byly prokázány rozsáhlé nekrózy floému, úbytek škrobu a docházelo k častému úhynu dřevin, fytoplazmy se u těchto hostitelů nacházely v malých koncentracích kvůli nepříznivému prostředí vytvořenému velmi citlivým hostitelem (Karte & Seemüller, 1991a, b).

## 2.8. Epidemiologie fytoplazem

Jelikož jsou fytoplazmy nebezpečnými patogeny rostlin, které způsobují velké ekonomické ztráty v zemědělství a uzdravování napadených rostlin je obtížné a finančně náročné, je nejdůležitější obranou proti fytoplazmám prevence. Proto je velmi důležité znát epidemiologii fytoplazem, která souvisí především s chováním hmyzích vektorů a jejich potravními preferencemi, které určují hostitelský okruh rostlin. Kromě hmyzích a rostlinných hostitelů jsou velmi důležité podmínky prostředí, ve kterých se hostitel nachází. Vzhledem k těmto znalostem lze určit maximální a minimální pravděpodobnost výskytu onemocnění způsobeného fytoplazmami například u různých zemědělských plodin (Constable, 2010). Je tedy vhodné mít zmapovaný terén v okolí pole či ovocného sadu a předpovědět tak nálet vektorů. Velmi účinnou ochranou proti nákaze fytoplazmami je oddělení vektorů a rostlin časově a prostorově (Madden *et al.*, 2007). Vytvoření takového plánu není jednoduché, jelikož fytoplazmy mají různý vztah k rostlinnému hostiteli. Zároveň vektoři fytoplazem mohou být jak polyfágní, tak monofágní. Například fytoplazmy skupiny žloutenky aster jsou přenášeny desítkami vektorů do stovek rostlinných hostitelů. Taktéž X-disease fytoplazma je přenášena mnoha vektory do mnoha hostitelských rostlin (Lee *et al.*, 2000). Současný počet vektorů přenášející různé fytoplazmy není definitivní. Jelikož stále dochází k přenosu fytoplazem na místa, kde nebyly původní. Následkem tohoto jevu dochází k rozsáhlým epidemiím. Příkladem takového rozšíření je epidemie fytoplazmy *flavescence doree* na vinné révě v jižní Evropě, kam byl introdukován *Scaphoideus titanus* (Weintraub & Wilson, 2010).

### **3. Materiál a metody**

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

## **4. Výsledky**

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

## **5. Diskuze**

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

## **6. Závěr**

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



## 7. Seznam použité literatury

- Abramovitch, R., Anderson, J. & Martin, G. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 601–611.
- Agrios, G. (1997). *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, California.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio & M. Arzone, A. (1997). Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 115–121.
- Andre, A., Maucourt, M., Moing, A., Rolin, D. & Renaudin, J. (2005). Sugar import and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: glucose and fructose play distinct roles. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 18, 33–42.
- Bai, X., Correa, V., Toruno, T., Ammar, E., Kamoun, S. & Hogenhout, S. (2009) AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22, 18–30.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S., Radek, A., Shevchenko, D., Tsukerman K., Walunas, T., Lapidus A., Campbell, J. & Hogenhout S. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.* 188, 3682–3696.
- Beanland, L., Hoy, C., Miller, S. & Nault, L.R. (2000). Influence of Aster Yellows Phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93, 271–276.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E. (2000). Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1145–1152.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673–689.
- Bos, L. (1999). *Plant viruses, unique and intriguing pathogens a textbook of plant virology*. Backhuys Publishers, Leiden.
- Bosco, D., Leoncini, P., Saracco, P., Raccach, B. & Marzachi, C. (2007). Interrelationships between ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 100, 1504–1511.
- Bruni, R., Pellati, F., Bellardi, M., Benvenuti, S., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. & Bianchi, A. (2005). Herbal drug quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 964–968.
- Brzin, J., Ermacora, P., Osler, R., Loi, N., Ravnikar, M. & Petrovic, N. (2003). Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110, 476–483.

- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin & Boudon-Padieu, E. (2003). A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42, 151–157.
- Constable, F. (2010). Phytoplasma Epidemiology: Grapevines as a model. In: Weintraub, G. & Johnes P. Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vectors. CAB International, Oxfordshire.
- Davey, J., Van Staden, J. & De Leeuw, G. (1981). Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiological Plant Pathology* 19, 193–200.
- Davis, R., sinclair, W., Lee, I.-M. & Dally. (1992). Cloned DNA probes specific for detection of mycoplasma-like organism associated with ash yellows. *Molecular Plant-Microbe interactions* 5, 163-169.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front.PlantSci.* 4, 155.
- Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 53–61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., & Asuyama, H. (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann.Phytopathol.Soc.Jpn.* 33, 259–266.
- Economou, A. (1999). Following the leader, bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiology* 7, 315–320.
- Favali, M., Musetti, R., Benvenuti, S., Bianchi, A. & Pressacco, L. (2004). *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma* 223, 45–51.
- Fialová, R. (2008). Interakce fytoplazem s rostlinným hostitelem a hmyzím vektorem. In: Navrátil, M. & Fialová, R. Fytoplazmy významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Firrao, G., Garcia-Chapa, M. & Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience* 12, 1353–1375.
- Fletcher, J., Shaw, M., Baker, G., Dugan, K., Ye, F., Sha, Y., Zuck, P. & Myers, G. (1996). Molecular characterization of *Spiroplasma citri* BR3 lines that differ in transmissibility by the leafhopper *Circulifer tenellus*. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 124–131.

Fránová, J. (2008). Metody detekce fytoplazmových onemocnění. In: Navrátil, M. & Fialová, R. Fytoplazmy významné patogeny rostlin. Česká fytopatologická společnost, Univerzita Palackého v Olomouci.

Galetto, L. & Marzachě. C. (2010). Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: Weintraub, G. & Johnes P. Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vestors. CAB International, Oxfordshire.

Gibb, K., Padovan, A. & Mogen, B (1995). Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85, 169 – 174.

Gundersen, D., Lee, I-M., Rehner, S., Davis R. & Kingsbury, D. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176, 5244.

Gundersen, D., Lee, I-M., Schaff, D., Harrison, N., Chang, C., Davis, R. & Kingsbury, 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). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 64–75.

Guthrie, J., Walsh, K., Scott, P. & Rasmussen, T. (2001). The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 23–30.

He, F., Lee, I-M., Hammond, R. & Zhao, Y. (1998). Preliminary investigation of the role of protein kinase gene expression in the induction of phyllody symptoms on plants infected with phytoplasmas. *Program Abstract, 12th Conference International Organization for Mycoplasmaology*, 184.

Hogenhout S. & Loria R (2008). Virulence mechanisms of Grampositive plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 11, 449-456.

Hogenhout, S. & Music, M. (2010). Phytoplasma Genomics, from Sequencing to Comparative and Functional Genomics – What Have We Learnt? In: Weintraub, G. & Johnes P. Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vestors. CAB International, Oxfordshire.

Hogenhout S., Oshima K., Ammar E., Kakizawa S., Kingdom H. & Namba S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 9, 403-423.

Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsua, K., Kagiwadab, S., Yamajia, Y. & Nambaa, S. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plant sidentified from a phytopathogenic bacterium. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.* 106, 6416–6421.

Hsu, T. & Bantari, E. (1979). Dual transmission of the aster yellows mycoplasma-like organism and the oat blue dwarf virus and its effect on longevity and fecundity of the aster leafhopper vector. *Phytopathology* 69, 843–845.

- Choi, Y., Tapias, E., Kim, H., Lefeber, A., Erkelens, C., Verhoeven, J., Brzin, J., Zel, J. & Verpoorte, R. (2004). Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology* 135, 2398–2410.
- Christensen, N., Axelsen, K., Nicolaisen, M. & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10, 526–535.
- Christensen, N., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17, 1175–1184.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas, J. & Dally, E. L. (1998). Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48, 269–277.
- Jones, J. & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jung, H., Miyata, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., et al. (2003). First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two RNA operons in the phytoplasma genome. *DNACellBiol* 22, 209–215.
- Juris, S., Rudolph, A., Huddler, D., Orth, K. & Dixon, J. (2000). A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase, actin binding, kinase activation, and cytoskeleton. *PNAS* 97, 9431–9436.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2001). Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14, 1043–1050.
- Kakizawa, S., Oshima, K. & Namba, S. (2010). Functional genomics of phytoplasmas. In: Weintraub, G. & Johnes P. *Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Oxfordshire.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology (UK)* 150, 135–142.
- Kaminska, M. & Silwa, H. (2003). Effect of antibiotics on the symptoms of stunting disease of *Magnolia liliiflora* plants. *Journal of Phytopathology* 151, 59–63.
- Kartte, S. & Seemüller, E. (1991a). Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *Journal of Phytopathology* 131, 149–160.
- Kartte, S. & Seemüller, E. (1991b). Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. *Journal of Phytopathology* 131, 137–148.

- Kesumawati, E., Kimata, T., Uemachi, T., Hosokawa, M. & Yazawa, S. (2006). Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. *Scientia Horticulturae* 108, 74–78.
- Kirkpatrick, B. (1992). Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In: Balows, A., Truper H., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. The prokaryotes, Springer, New York, 4050–4067.
- Kirkpatrick, B. C., Smart, C. D., Gardner, S., Gao, J., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz, K.-H., Seemueller, E., Harrison, N., Namba, S. & Daire, X. (1994). Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Lett* 3, 228–229.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., & Seemüller, E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *Sci. World J.* 2012, 185942.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A., et al. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* 9, 306.
- Kuske, C. & Kirkpatrick, B. (1992). Distribution and multiplication of western aster yellows mycoplasma-like organisms in *Catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathology* 82, 457–462.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K., Zhao, Y., Davis R. & Harrison N. (2010). Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2887–2897
- Lee, I.-M., Davis, R. & Gundersen-Rindal, D. (2000). Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54, 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D., Davis, R. & Bartoszyk, I. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153–1169.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D., Davis, R., Bottner, K., Marccone C. & Seemüller E. (2004). 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 1037–1048.
- Lee, R., Nyland, G. & Lowe, S. (1987). Chemotherapy of cherry buckskin and peach yellow leafroll diseases: an evaluation of two tetracycline formulations and methods of application. *Plant Disease* 71, 119–121.
- Leon, R., Santamaria, J., Alpizar, L., Escamilla, J. & Oropeza, C. (1996). Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytologist* 134, 227–234.

- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E. and Seemuller, E. (1999). Effect of phytoplasmal infection on concentration and traslocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 59–68.
- Liefting, L., Shaw, M. & Kirkpatrick, B. (2004). Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leaf hopper-transmitted virescence agent. *Microbiology* 150, 1809–1817.
- Lim, P. & Sears, B (1992). Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.* 174, 2606 – 2611.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U. & Seemüller, E. (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Madden, L., Hughes, G. & Van Den Bosch, F. (2007). *The Study of Plant Disease Epidemics*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Madden, L., Nault, L., Murrall D. & Apelt, M. (1995). Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellows disease in lettuce. *Researches on Population Ecology* 37, 279-289.
- Maixner, M., Langer, M. & Gerhard, Y. (2006). Epidemiological characteristics of bois noir type I. *Extended Abstracts 15th Meeting ICVG*, 86–87.
- Makarova, O., Contaldo N., Paltrinieri S., Kawube G., Bertaccini A. & Nicolaisen (2012). DNA barcoding for identification of ‘*Candidatus Phytoplasmas*’ using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE* 7, e52092.
- Maramorosch, K. (1958). Cross-protection between two strains of corn stunt virus in an insect vector. *Virology* 6, 448–459.
- Marcone, C. (2010). Movement of phytoplasmas and the development of disease in the plant. In: Weintraub, G. & Johnes P. *Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Oxfordshire.
- Marcone C., Lee, I.-M., Davis, R., Ragozzino, A. & Seemüller, E. (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1703–1713.
- Marcone, C. & Ragozzino, A. (1996). Comparative ultrastructural studies on genetically different phytoplasmas using scanning electron microscopy. *Petria* 6, 125–136.
- Marzachi, C., Milne, R. & Bosco, D. (2004). Phytoplasma–plant–vector relationships. In: Pandalai, S. & Gayathri, A. *Recent Research Development in Plant Pathology*, Vol. 3. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India, 211–241.

- Maust, B., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaria, J. & Oropeza, C. (2003). Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93, 976–981.
- Mayer, C., Vilcinskas, A. & Gross, J. (2008a). Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1045–1049.
- Mayer, C., Jarausch, B., Jarausch, W., Jelkmann, W., Vilcinskas, A. & Gross J. (2009) *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. *Phytopathology* 99, 729-738.
- McCoy, R. (1982). Antibiotic treatment for control of tree diseases associated with mycoplasma-like organism. *Reviews of Infectious Diseases* 4, 157–161.
- McCoy, R. (1979). Mycoplasmas and yellows diseases. In: Whitcomb, R. & Tully, J. The Mycoplasmas, Academic Press, New York, 229–264.
- McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T., Chiykowski, L., Cousin, M., Dale, J., de Leeuw, G., Golino, D., Hackett, K., Kirkpatrick, B., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R., Sugiura, M., Whitcomb, R., Yang, I., Zhu, B. & Seemuller, E. (1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb, R.F. & Tully, J.G. The Mycoplasmas, Academic Press, San Diego, California, 545–640.
- Milne, R., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarindu, N. & Clark, M. (1995). Preembedding and postembedding immunogold labeling and electron-microscopy in plant host tissues of 3 antigenically unrelated MLOs – primula yellows, tomato big bud and bermudagrass white leaf. *European Journal of Plant Pathology* 101, 57–67. *Annals of Applied Biology* 159, 41–48.
- Mitrović, J., Kakizawa, S., Daduk, B., Oshima, K., Namba, S. & Bertaccini, A (2011). The groEL gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Annals of Applied Biology* 159, 41-48.
- Miura, C., Sugawara, K., Neriya, Y., Minato, N., Keima, T., Himeno, M., Maejima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. (2012). Functional characterization and gene expression profiling of superoxide dismutase from plantpathogenic phytoplasma. *Gene* 510, 107–112.
- Monis, P. & Giglio, S. (2006). Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infection Genetics and Evolution* 6, 2–12.
- Mori, N., Pavan, F., Bondavalli, R., Reggiani, N., Paltrinieri, S. & Bertaccini, A. (2008). Factors affecting the spread of 'Bois Noir' disease in north Italy vineyards. *Vitis* 47, 65–72.
- Musetti, R. (2010). Biochemical Changes in Plants Infected by Phytoplasmas. In: Weintraub, G. & Jones P. Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vectors. CAB International, Oxfordshire.
- Musetti, R., Marabottini, R., Badiani, M., Martini, M., Sanita di Toppi, L., di Borselli, S., Borgo, M. & Osler, R. (2007). On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine

(*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence doree disease. *Functional Plant Biology* 34, 750–758.

Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.-Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2002). Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148, 1389–1396.

Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraiishi, T., Yamaji, Y. & Namba, S. (2011). Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* 6: e23242.

Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Ishii, Y., Hoshi, A., Hayashi, Y., Kagiwada, S. & Namba, S. (2007). Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus* Phytoplasma asteris. *Molecular Plant Pathology* 8, 481–489.

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, 27–29.

Osler, R., Carraro, L., Ermacora, P., Ferrini, F., Loi, N. Loschi, A., Martini, M., Mutton, P. & Refatti, E. (2003). Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas. *14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine (ICVG)*, 68.

Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L. & Osler, R. (1998). Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* L. infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* 95, 13–23.

Purcell, A. (1982). Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 20, 397–417.

Purcell, A., Richardson, J. & Finlay, A. (1981). Multiplication of the agent of X-disease in a non-vector leafhopper *Macrostelus fascifrons*. *Annals of Applied Biology* 99, 283–289.

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

Rinaldis, E. & Lahm, A. (2006). DNA microarrays, current applications. Horizon Biosciences, Wymondham.

Seemuller, E., Garnier, M. & Schneider, B. (2002). Mycoplasmas of plants and insects. In: Razin, S. & Hermann, R. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 91–115.



- Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R. & Kuhn, A. (2004). *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO Journal* 23, 294–301.
- Shen, W. & Lin, C. (1993). Production of monoclonal-antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweet-potato witches-broom. *Phytopathology* 83, 671–675.
- Shiomi, T. & Sugiura, M. (1984). Grouping of mycoplasma-like organisms transmitted by the leafhopper vector, *Macrostelus orientalis* Virvaste, based on host range. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 50, 149–157.
- Schaff, D., Lee, I.M. & Davis, R. (1992). Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 1503–1509.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C. & Seemüller, E. (1993). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J Gen Microbiol* 139, 519–527.
- Schneider, B., Gibb, K. & Seemüller, E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. & Kirkpatrick, B. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, R. & Tulley, J.G. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press, San Diego, California, 369–380.
- Siddique, A., Guthrie, J., Walsh, K., White, D. & Scott, P. (1998). Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease* 82, 1112–1120.
- Skrzeczowski, L., Howell, W., Eastwell, K. & Cavileer, T. (2001). Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Proceedings of The 18<sup>th</sup> International Symposium on Virus & Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Top Fruit Diseases* 1,2; 417–424.
- Smart, C. & Kirkpatrick, B. (1996). Identification of host plant genes whose expression is altered upon aster yellows phytoplasma infections. *IOM Letters* 4, 274.
- Strauss, E. (2009). Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325, 388–390.
- Sugawara, K., Honma, Y., Komatsu, K., Himeno, M., Oshima, K., & Namba, S. (2013). The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *PlantPhysiol.* 162, 2005–2014.
- Sugio, A., & Hogenhout, S. (2012). The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 247–254.

- Sugio, A., Kingdom, H., MacLean, A., Grieve, V., & Hogenhout, S. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108, 1254–1263.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M. & Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 4252–4257.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. & Koptíková J. (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně.
- Tan, P. & Whitlow, T. (2001). Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmal infection. *New Phytologist* 150, 757–769.
- Tao, Y., Man J. & Wu Y. (2012). Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China.
- 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.
- Toruno, T., Music, M., Simi, S., Nicolaisen, M. & Hogenhout, S. (2010). Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol. Microbiol.* 77, 1406–1415.
- Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. & Gibb, K. (2008). Comparative genome analysis of ‘*Ca. P. australiense*’ (subgroup *tuf*-Australia I; *rp-A*) and ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190, 3979–3991.
- Tsai, J. H. (1979). Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: Whitcomb, R. & Tully, J. *The Mycoplasmas*. Academic Press, New York, NY, 265–307.
- Vibio, M., Bertaccini, A., Lee, I.-M., Davis, R. E. & Clark, M. F. (1996). Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. *Phytopathol Mediterr* 35, 33–42.
- Wally, O., El Hadrami, A., Khadhair, A., Adam, L., Shinnars-Carnelley, T., Elliott, B. & Daayf, F. (2008). DNA sequencing reveals false positives during the detection of aster yellows phytoplasmas in leafhoppers. *Scientia Horticulturae* 116, 130–137.
- Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H.-Y., Nishigawa, H., Miyata, S.-I., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T. & Namba, S. (2004). In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology* 94, 244–250.

Weintraub, P. & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasma. *Annual Review of Entomology* 51, 91–111.

Weintraub, P. & Wilson, M. (2010). Control of Phytoplasma Diseases and Vectors. In: Weintraub, G. & Johnes P. Phytoplasmas- genomes, plant hosts and vectors. CAB International, Oxfordshire.

Weisburg, W., Tully, J., Rose, D., Petzel, J., Oyazu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T., Van Etten, J., Maniloff, J. & Woese, C. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171, 6455–6467.

## **8. Přílohy**

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