

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici



Hodnocení vzájemného synergismu fytoplazmy ESFY a viru
šarky švestky (PPV) u meruněk a broskvoní.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Nečas, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Barbora Vašková

Lednice 2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Bc. Barbora Vašková**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Zahradnictví
Konzultant: Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava – VÚRV Praha
Název tématu: **Hodnocení vzájemného synergismu fytoplazmy ESFY a viru šarky švestky (PPV) u meruněk a broskvoní.**
Rozsah práce: 40 stran

Zásady pro vypracování:

1. Zpracovat literární přehled k problematice fytoplazmy ESFY a viru PPV u meruněk a broskvoní a dále přehled problematiky diagnostiky virů a fytoplazem (k metodám PCR a ELISA).
2. Zpracovat literární přehled k problematice vzniku infekcí u virů a fytoplazem, synergického nebo antagonistického vlivu těchto organismů na průběh onemocnění, symptomatologii a diagnostiku.
3. V založeném experimentu v pravidelných intervalech hodnotit symptomatický projev viru a fytoplazmy a jejich případné interakce. Pomocí metod qPCR a ELISA hodnotit koncentraci jednotlivých patogenů.
4. Pomocí statistických metod vyhodnotit vliv koncentrace patogenu na symptomatický projev a vzájemnou interakci. Zpracovat grafy, tabulky a fotodokumentaci experimentu.

Seznam odborné literatury:

1. DICKINSON, M. – HODGETTS, J. *Phytoplasma : methods and protocols*. New York: Springer, 2012. 421 s. ISBN 978-1-62703-088-5.
2. NAVRÁTIL, M. – FIALOVÁ, R. *Fytoplazmy významné patogeny rostlin*. 1. vyd. Kostelec na Hané: Univerzita Palackého v Olomouci a Česká fytopatologická společnost, 2008. 147 s. ISBN 80-903545-2-1.
3. HARRISON, N A. – RAO, G P. – MARCONE, C. *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Texas: Studium Press LLC, U.S.A., 2008. 422 s. ISBN 1-933699-30-2.
4. BERTACCINI, A. – LAVINA, A. – TORRES, E. *Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management*. 1. vyd. 2010.
5. MUKERJI, K G. *Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria*. [Dordrecht]: Springer, 2008. 419 s. ISBN 978-1-4020-8570-3.
6. WEINTRAUB, P G. – JONES, P. *Phytoplasmas : genomes, plant hosts, and vectors*. Cambridge, MA: CABI North American Office, 2010. 331 s. ISBN 978-1-84593-530-6.
7. DESVIGNES, J. *Virus Diseases of Fruit Trees : Diseases due to viroids, viruses, phytoplasmas and other undetermined infectious agents*. Paris: CTIFL, 1999. 202 s. ISBN 2-87911-143-9.

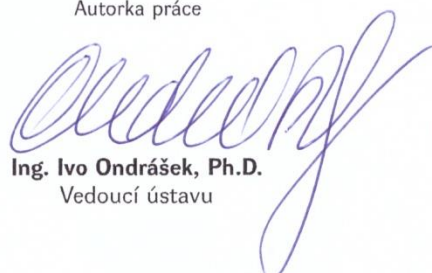
Datum zadání diplomové práce: říjen 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2017

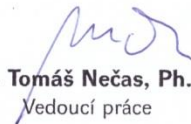
L. S.



Bc. Barbora Vašková
Autorka práce



Ing. Ivo Ondrášek, Ph.D.
Vedoucí ústavu



Ing. Tomáš Nečas, Ph.D.
Vedoucí práce



prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D
Děkan ZF MENDELU

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou prací na téma „Hodnocení vzájemného synergismu fytoplazmy ESFY a viru šarky švestky (PPV) u meruněk a broskvoní.“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací. Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 Autorského zákona. Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici, dne

Podpis

Poděkování

Děkuji tímto vedoucímu mé diplomové práce – Ing. Tomášovi Nečasovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a velkou pomoc při vypracovávání této práce. Celé mé rodině za podporu během celého studia.

Obsah

1	Cíle diplomové práce.....	8
2	Úvod.....	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Meruňky.....	10
3.1.1	Odrůdy.....	10
3.2	Broskvoně.....	12
3.1.1	Odrůdy.....	12
3.2	Podnože.....	13
3.3	Šarka švestky.....	14
3.3.1	Historie.....	15
3.3.2	Charakteristika.....	15
3.3.3	Symptomy a projevy.....	17
3.3.4	Diagnostika.....	18
3.3.5	Ochrana.....	19
3.3.6	Rezistentní odrůdy.....	19
3.3.7	Projekt SharCo.....	20
3.4	Fytoplazma ESFY.....	21
3.4.1	Historie.....	21
3.4.2	Charakteristika.....	22
3.4.3	Fytoplazma ESFY.....	23
3.4.4	Symptomy a projevy.....	25
3.4.5	Ochrana a přenos.....	26
3.5	Diagnostika.....	26
3.5.1	Detekční metody:.....	27

3.5.2	Molekulární metody	27
3.5.3	PCR	27
3.5.4	ELISA.....	28
3.5.5	Další diagnostické metody	29
3.6	Synergický efekt směsných infekcí	30
3.7	Interakce mezi viry	30
3.7.1	Interakce mezi příbuznými viry.	31
3.7.2	Interakce mezi nepříbuznými viry.....	33
3.7.3	Interakce ostatních mikroorganismů	33
4	Materiál a metodika.....	35
4.1	Charakteristika stanoviště.....	35
4.2	Rostlinný materiál.....	35
4.3	Založení praktické části	36
4.4	Zpracování výsledků.....	37
4.5	Výsledky	38
4.6	Diskuse	45
5	Závěr.....	48
6	Souhrn	50
7	Resume	51
8	Seznam použité literatury	52
	Seznam obrázků	59
	Seznam tabulek.....	60
	Seznam grafů.....	62
	Přílohy	63

1 Cíle diplomové práce

Cílem této práce je vyhodnotit vzájemný synergismus fytoplazmy ESFY a viru šarky švestky (PPV) u meruněk a broskvoní v průběhu sledovaného období, dále zpracovat literární přehled k dané problematice týkající se fytoplazmy ESFY a viru PPV, jejich diagnostiky pomocí metod PCR a ELISA. Zpracovat problematiku týkající se synergického a antagonického působení virových a fytoplazmatických onemocnění na rostlinách. Zpracovat výsledky pokusu praktické části.

2 Úvod

Meruňky a broskvoně jsou již od pradávna na našem území velice oblíbenými ovocnými dřevinami, které jsou hojně pěstovány v komerčních výsadbách i soukromých zahradách. Plody jsou velice oblíbené pro své široké využití nejen v podobě určené pro přímý konzum. V dnešní době ale jejich produkční plochy hlavně u broskvoní klesají. Dle situační a výhledové zprávy Ministerstva zemědělství z roku 2011 od roku 2007 do 2011 klesnul počet plodných výsadeb meruněk z 1407 ha na 1127 ha a u broskvoní z 1032 ha na 721 ha.

Fytoplazma ESFY známá jako Evropská žloutenka peckovin je závažné rostlinné onemocnění způsobované '*Candidatus phytoplasma prunorum*'. Jedná se o vážnou rostlinnou chorobu způsobující úhyn meruněk a broskvoní většinou do dvou let od projevení prvních symptomů. Díky lokalizaci patogenu v rostlině v sítkovicích, dochází k ucpávání cévních svazků a nemůže probíhat translokace látek v rostlině. Při evropské žloutence peckovin dochází k znehodnocení listové plochy a později k naprostému opadu listů.

Oproti tomu virus *Plum Pox virus* v česku známý jako šarka švestky je virovým onemocněním způsobeným potyvirem. Onemocnění bylo poprvé popsáno roku 1917 v Bulharsku a poté se rozšířilo téměř do všech zemí Evropy. V Evropě mělo toto onemocnění naprosto devastující účinky. Jedná se o jednu z nejzávažnějších rostlinných viróz. Vzhledem k neexistující ochraně došlo v historii k vykácení miliónů stromů a velmi vysokým ekonomickým ztrátám. U obou onemocnění není známá efektivní léčba, takže v případě výskytu onemocnění je nutná úplná likvidace výsadby. Vzhledem k šíření těchto onemocnění pomocí vegetativně množeného materiálu je riziko souběžné infekce poměrně vysoké. Tato onemocnění jsou detekována pomocí diagnostických metod jako PCR, ELISA, RFLP a dalšími.

3 Literární přehled

3.1 Meruňky

Meruňka latinským názvem *Prunus armeniaca* L. často používaným synonymem je *Armeniaca vulgaris* Lam. Taxonomicky řadíme meruňku do řádu *Rosales* Bercht. & J. Presl, čeledě *Rosaceae* Juss., a rodu *Prunus* (www.theplantlist.org).

Tisíce let byly meruňky pěstovány na horských svazích oblastí střední Asie a Číny. V některých regionech jsou meruňky více ceněné pro jejich semena a olej, který se ze semen lisuje než pro jejich plody. V současné době jsou meruňky pěstovány převážně kvůli plodům na přímý konzum (JANICK, 1996).

V našich podmínkách se vyskytují pouze odrůdy z evropské skupiny. V novošlechtění zajímavou roli zastávají některé středoasijské odrůdy pro svou mrazuvzdornost. Mezi další známé druhy rostoucí v odlišných podmínkách patří: meruňka japonská (*A. mume* Sieb.), meruňka davidova (*A. davidiana* Carr.), meruňka ansu (*A. ansu* Max.), meruňka sibiřská (*A. sibirica* L.), meruňka brigantská (*A. brigantiaca* Vill.) a také kříženec mezi meruňkou a myrobalánem meruňka černá (*A. dasycarpa* Ehrh.). Za centrum původu meruňky je považována oblast severní Číny. Na naše území se pravděpodobně dostala meruňka již s římskými legiemi v polovině 2.stol n.l., ale až v době renesance v 16. století se sortiment obohatil o teplomilné druhy. (BAŽANT, 2004).

Meruňka je diploidní ($2n = 16$ chromozómu), jedná se o rostlinu většinou samosprašnou, přičemž pro opylování jsou nutné včely (KUTINA *et al.*, 1991).

3.1.1 Odrůdy

Vestar

Odrůda původem ze Slovenska. Její registrace proběhla v roce 2000. Jedná se o odrůdu středně nenáročnou na polohu. Půdy vyžaduje výživné a vlhké. Jde o odrůdu bujného vzrůstu. Koruna je rozložitá a řídká. Není náročná na výběr

podnože. Plody jsou velké až velmi velké, oválné. Slupka je oranžová s červeným středně velkým líčkem. Dužnina je slabě odlučitelná od pecky, tmavě oranžová, tuhá, středně šťavnatá, sladce navinulá, aromatická, dobrá. Do plodnosti vchází brzy. Plodnost je velká a pravidelná. Dozrává 5 dnů po odrůdě 'Velkopavlovická'. Tvar se upřednostňuje čtvrtkmen nebo polokmen. Odolnost proti nízkým teplotám je vysoká. Jedná se tedy o středně ranou odrůdu s velkými atraktivními plody, vhodnými převážně pro přímý konzum vzhledem k slabé odlučitelnosti od pecky. Může být vysazována i do okrajových oblastí vhodných pro meruňky (RICHTER, 2002).

Saldcot

Odrůda původem z Kanady. Saldcot je odrůdou se symetrickými, eliptickými plody. Odrůda malého vzrůstu s malými plody se středně velkou peckou a vysokým podílem dužniny. Dužnina je oranžová bez vláken. Chuť dobrá a harmonická. Slupka je oranžová s růžovým líčkem. Pecka je dobře odlučitelná. Odrůda je velmi náchylná na chlad (Web GRIN-Global: GRIN Czech 1.9.1 [online], 2017).

Poyer

Odrůda Poyer má symetrické plody s rozdělením po celé délce plodu. Plody jsou malé s peckou s vysokou hmotností. Dužnina je velmi snadno odlučitelná od pecky. Slupka je tmavě oranžová s fialovo-červeným líčkem. Dužnina je oranžová, hutná, středně šťavnatá s velmi dobrou chutí (Web GRIN-Global: GRIN Czech 1.9.1 [online], 2017).

3.2 Broskvoně

Broskvoň latinským názvem *Prunus persica* L. Batsch. používaným synonymem je *Amygdalus persica* L. Taxonomicky řadíme broskvoň do řádu *Rosales* Bercht. & J. Presl, čeledě *Rosaceae* Juss., a rodu *Prunus* (www.theplantlist.org).

Broskvoně pocházejí původně z Číny, kde byly známy již ve 3. tisíciletí před naším letopočtem. V některých pramenech jsou jako země původu uváděny země bývalé Persie dnešního Iránu. Broskvoň obecná [*Prunus persica* (L) B a t s c h] patří do čeledi *Rosaceae* – růžovité, rodu *Prunus* L. [subg. *Persica* M i l l., *Amygdalus* L.]. Linné zařadil broskvoň již v roce 1753 do rodu *Amygdalus* pod názvem *Amygdalus Persica*. (KUTINA *et al.*, 1991)

Broskvoně jsou diploidním ($2n = 16$ chromozómů) ovocným druhem (KUTINA *et al.*, 1991).

Broskvoně jsou pěstovány na celkové ploše 840 ha sadů na území České republiky. Celková plocha výsadeb se ale v průběhu posledních let snižuje. Jednou z hlavních příčin je silná evropská konkurence na trhu broskví. Příčinou je silná konkurence převážně z Itálie, Řecka a Španělska (LUDVÍK, 2010).

3.1.1 Odrůdy

Suncrest

Odrůda původem z USA kříženec mezi 'Alamar' a 'Gold Dust'. Jedná se o odrůdu středně náročnou na polohu. Půdu preferuje s vyšším obsahem živin. Květ má zvonkolistý. Jde o odrůdu středního vzrůstu. Koruna je polovzpřímená s dostatkem plodonosného obrostu. Vhodnými podnožemi jsou B-VA-1, B-VA-2 a 'Lesiberian'. Plody jsou velké, kulovité až plošně kulovité. Slupka je středně tlustá, žlutá, na většině plodu překrytá tmavě karmínovou červení. Dužnina je dobře odlučitelná od pecky, pevná, žlutá a výborné chuti. Do plodnosti vchází brzy. Pokud je umístěna na vhodných stanovištích, je plodnost velká a pravidelná. Tvar se upřednostňuje čtvrtkmen i zploštělé větveno. Plody dozrávají asi 18 dní po odrůdě 'Redhaven'. Odolnost proti nízkým teplotám i chorobám

je střední. Jedná se tedy o pozdní žlutomasou odrůdu s atraktivními plody, vhodnými jak pro přímý konzum, tak pro konzervářské zpracování. Je používána do velkovýsad i do malých soukromých zahrádek (RICHTER, 2002).

Diamond Princess

Odrůda pochází z Kalifornie, USA. Diamond Princess je žlutomasou odrůdou. Do plodnosti vchází středně brzy, zhruba v polovině srpna, o deset dní později než Red Heaven. Plody má velké, vybarvené. Plody jsou v době zrání dobře odlučitelné od pecky. Diamond Princess je středně úrodnou odrůdou. Její pěstování na našem území není dostatečně prověřeno (LITSCHMANN, *et al.*, 2007).

Miss Italia

Odrůda pochází z Itálie. Miss Italia je žlutomasou odrůdou. Plodnost je pravidelná, Miss Italia do ní vchází v polovině srpna. Odrůda má zvýšenou odolnost květních pupenů. Miss Italia může být použita i do průměrných poloh. Plody mají přitažlivý vzhled. Tato odrůda dorůstá střední velikosti. V dobrých letech je nutná náročná probírka (LITSCHMANN, *et al.*, 2007)

3.2 Podnože

M-LE-1

Jedná se o cizosprašný semenáč odrůdy Julskij 205. Podnož je vhodná do středně těžkých hlinitopísčitých půd s obsahem vápníku maximálně 8 %, těmto podnožím vyhovuje neutrální až mírně alkalická reakce. Semena jsou dobře klíčivá, afinita s meruňkami dobrá. Je používána i jako kmenotvorná odrůda a uvádí se jako podnož zvyšující plodnost (BAŽANT, 2004).

Saint Julien A

Saint Julien A je podnoží snadno množitelnou dřevitými řízkami. Tato podnož se projevuje dobrou afinitou se standardními meruňkovými odrůdami. Saint Julien A je podnož vhodná do těžších půd s pH 6,5 – 7,0. V těchto půdách Saint Julien A zvyšuje odolnost k bakteriózám, na lehčích půdách naopak senzibilizuje. Saint Julien A je vhodná pro intenzivní pěstitelské tvary (BAŽANT, 2004).

Myrobalány

Do skupiny používaných myrobalánů patří široké spektrum rostlin, jako jsou Myrobalán 29 C z Kalifornie, Myrobalán B z Anglie, Myrocar Fercino a Myrabi Myrest z Francie a mnoho dalších. Vyrůstání meruňek na vegetativně množených myrobalánech je ve srovnání se semennými slabší. I přesto se myrobalány řadí ke středně až silně rostoucím podnožím (BAŽANT, 2004).

3.3 Šarka švestky

Plum pox virus (PPV), který způsobuje onemocnění šarka švestky, (neštovice švestky) je taxonomicky řaděn do čeledi *Potyviridae* rodu *Potyvirus*. Do čeledi *Potyviridae* spadá polovina všech známých rostlinných virů a je považována za nejškodlivější skupinu rostlinných virů (GLASA, CANDRESSE, 2008).

PPV způsobuje nemoc šarka švestky u rodu *Prunus*, do kterého spadají a přirozeným hostitelem jsou *P. domestica*, *P. cerasifera*, *P. armeniaca*, *P. persica*, *P. amygdalo-persica* (HULL, 2009).

Plum pox virus může také infikovat široké spektrum planě rostoucích a okrasných druhů rodu *Prunus*, tento fakt musí být zohledněn zejména ve školkařství, neboť i okrasné dřeviny mohou být významným zdrojem infekce pro ovocné výsadby (GLASA, CANDRESSE, 2008).

Výskyt PPV byl zaznamenán ve většině zemí Evropy, v některých oblastech Asie, celé oblasti Mediteránu a některých oblastech Severní a Jižní Ameriky (GLASA, CANDRESSE, 2008).

3.3.1 Historie

Výskyt šarky byl poprvé zaznamenán na meruňce v Bulharsku roku 1933. V Československu byl dle Smolák, Novák, 1956 výskyt šarky švestky prokázán v roce 1952. Šarka se však objevovala na našem území mnohem dříve. Smolák již v roce 1926 popsal mozaikovou chorobu na mirabelce, která byla s velkou pravděpodobností způsobena právě virem šarky švestky. Ještě před druhou světovou válkou byla šarka švestky pozorována v Jugoslávii (Josifović, 1937), Maďarsku (Szirmai, 1948) v Rumunsku byla choroba pozorována v roce 1941. Po druhé světové válce se nemoc šířila dál na západ, roku 1984, kdy byla šarka švestky zjištěna ve Španělsku a Portugalsku. V devadesátých letech byla šarka švestky zavlečena do Jižní i Severní Ameriky. Úplná sekvence nukleotidů R5NA kmene PPV-NAT byla stanovena roku 1989 Maiss *et al.* Tehdy zjistili 9741 nukleotidů celkové RNA. Teycheney *et al.*, (1989) stanovili délku RNA u kmene PPV-D a to 9787 nukleotidů (POLÁK, 2010).

3.3.2 Charakteristika

PPV má široké hostitelské spektrum od meruňky, švestky domácí, broskvoně, nektarinky, mandloně přes plané druhy jako jsou myrobalán a trnka obecná až po okrasné dřeviny jako jsou mandloň nízká, slivoň americká, višěň a třešeň (KOCOUREK, 2015).

Jde o jednu z nejvýznamnějších a nejškodlivějších virových chorob slivoně, broskvoně, nektarinky a meruňky v oblasti střední Evropy. Je epidemicky šířena polyfágním RNA virem (PAPRŠTEJN *et al.*, 2015).

Čeď *Potyviradeae* je největší a nejškodlivější skupinou rostlinných virů. Tato čeď zahrnuje více jak 400 druhů, což je polovina známých rostlinných virů (POLÁK, 2010).

PPV je v rodu *Potyvirus* typovým členem Y-virus bramboru (PAPRŠTEJN *et al.*, 2015).

Virion PPV je vláknitého charakteru o délce 750nm a síle 13nm. Viditelný je díky elektronovému mikroskopu. Virová částice se skládá z infekční jednovláknové RNA nukleové kyseliny a obalového proteinu, který ji chrání. Celkové počty nukleotidů virionu jsou závislé na konkrétním kmenu viru, hodnota může být například 9787 u francouzského izolátu kmenu PPV-D nebo 9741 u německého izolátu PPV-NAT (GLASA, CANDRESSE, 2008).

Plum Pox virus je velice variabilní, ať už geneticky nebo biologicky. V praxi je tento jev pozorovatelný tak, že dvě identické rostliny infikované rozdílnými izoláty PPV mohou vykazovat rozdílné symptomy choroby. Obvykle i malá změna ve struktuře genomu způsobí změnu fenotypových vlastností izolátu, agresivity, nebo virulence patogenu. Možné změny ovlivňující tyto faktory jsou změna aminokyseliny, aminokyselinového motivu a další. Stejně jako u jiných RNA virů s monopartytným genomem, tak i u viru šarky švestky jsou zdrojem genetické variability rekombinace virového genomu a mutace. Na základě nejnovějších analýz dělíme izoláty PPV do 7 kmenů, které jsou odlišné sérologickými, molekulárními i biologickými vlastnostmi: PPV-M, PPV-D, PPV-Rec, PPV-C, PPV-EA, PPV-W, PPV-T. V České republice se vyskytují 3 kmeny PPV a to PPV-D, PPV-Rec a PPV-M. Izoláty PPV-D (Dideron) napadají všechny druhy *Prunus* kromě třešní a višní. Na broskvoních je výskyt PPV-D omezený. Izoláty PPV-M (Marcus) byly zjištěny ve většině evropských zemí. Druh PPV-M je často spojován s rychlými epidemiemi na broskvoních. PPV-M není příliš často pozorován na švestkách. Kmen PPV-Rec (Recombinant) vznikl homologickou rekombinací mezi PPV-D a PPV-M s rekombinačním bodem lokalizovaném v 3' terminální oblasti N1b genu. V přirozených podmínkách se izoláty PPV-Rec téměř nevyskytují na meruňkách, ale silně napadají švestky. Dalšími kmeny jsou: PPV-C (Cherry) jehož výskyt byl prokázán na třešních v Moldávii, Rumunsku a Bulharsku, dále na višních v Itálii a Maďarsku a podnožových slivoních v Bělorusku. PPV-W (Winona) na švestce v Kanadě, Ukrajině, Lotyšsku a Rusku. Izoláty PPV-T (Turkey) byly zaznamenány

v Turecku na švestce, broskvoni a meruňce. Posledním kmenem je PPV-EA (El Amar). Tento kmen byl pozorován na broskvoních, meruňkách a švestkách v Egyptě (GLASA, 2010).

Na našem území převažuje kmen Dideron (PPV-D), který se vyskytuje u více než 95 % infikovaných stromů. Silně patogenní kmeny jako PPV-M, nebo rekombinantní PPV-Rec byly na českém území pozorovány jen velmi ojediněle, a to převážně na Moravě. Většina rostlin infikovaných PPV-M pochází z dovezeného školkařského materiálu ze zahraničí (PAPRŠTEJN *et al.*, 2015).

Termální bod pro inaktivaci viru ve šťávě je 52-58°C. Při této teplotě dojde ke ztrátě infekivity už po deseti minutách. Životnost viru *in vitro* (mimo rostlinu) při pokojové teplotě se pohybuje mezi třemi až čtyřmi dny. Virus je imunogenní, proto se v krvi teplokrevných zvířat proti němu tvoří protilátky. Virus je možné purifikovat, např. ze šťávy tabáku a připravit proti viru protilátky a použít k diagnostickým účelům (POLÁK, 2010).

Inkubační doba je závislá na způsobu infekce i prostředí. Po inokulaci v půli léta se choroba při polních podmínkách objeví za 8 měsíců, oproti tomu ve skleníku jsou patrné symptomy již po třech týdnech od jarní inokulace (PALEUCHOVÁ, 1980).

U meruňek a broskvoní onemocnění způsobuje snížení mrazuvzdornosti, úrody a kvality plodů. Při důkladném prostudování a porovnání symptomů by nemělo docházet k záměně s jinými chorobami (HUDEC, GUTTEN, 2007).

3.3.3 Symptomy a projevy

Projevy onemocnění jsou velice variabilní. Liší se dle druhu a odrůdy hostitele, dle kmene, respektive sérotypu viru a jsou významně ovlivňovány průběhem počasí. U slivoně jsou příznaky onemocnění na listech, plodech a výjimečně i na peckách. Na listech vznikají světlé až žlutozelené skvrny, kroužky, proužky a ornamentální kresby. Okraje skvrn nejsou ostře ohraničeny, jsou difuzní. Příznaky jsou na listech zřetelné již od května, u většiny odrůd se v pozdním létě intenzita příznaků zmenšuje. U některých odrůd se skvrny nebo

okraje skvrn koncem léta zbarvují červenofialově nebo hnědofialově. (HLUCHÝ *et al.*, 1997)

Symptomy jsou viditelné nejvíce tehdy, při pohledu proti světlu. Čepel výrazně napadených listů je nerovná, zvrásněná. (CIFRANIČ, 1987)

U broskvoní se symptomy objevují na petalách, listech i plodech. Na petalách se choroba projevuje diskoloracemi. Symptomy na listech jsou světle zelené skvrny, chlorotické puntíky, pásy a kroužky, světlé skvrny kopírující žilnatinu, pozorovány byly i deformace listů. Na plodech nakažených rostlin byly pozorovány chlorotické puntíky nebo nepigmentované žluté kroužky. Také plody mohou být deformované a nepravidelně tvarované s výskytem malých hnědých nekrotizujících skvrn. Nakažené plody mohou vykazovat vnitřní hnědnutí plodu a snižování celkové kvality. V určitých případech byl také pozorován předčasný opad plodů (LAYNE, 2008).

3.3.4 Diagnostika

Včasná, spolehlivá a správná diagnostika patogenu je nutná pro zvolení vhodných ochranných opatření k potlačení nebo omezení šíření patogenu. Zmíněné pravidlo platí i pro šarku švestky. Stromy infikované PPV nelze léčit. Jedinou dnes známou ochranou je likvidace nemocných rostlin. Diagnostika PPV se provádí pomocí sérologických, biologických a molekulárních metod. Diagnostika choroby vizuálním hodnocením příznaků není vhodná, protože příznaky jsou velice různorodé a odvíjejí se od virulence patogenu, druhu rostliny a také velice snadno může být zaměněno za jiné virové onemocnění jako například chlorotickou skvrnitost jabloně (ACLSV) nebo nekrotickou kroužkovitostí třešně (PNRSV). V těchto případech záměny se jedná o pseudošarku (KOMÍNEK, 2010).

PPV bylo úspěšně detekováno použitím běžného PCR (Wetzel *et al.*, 1991; Levy and Hadidi, 1994; Candresse *et al.*, 1995; Faggoli *et al.*, 1998), immune-capture PCR (Wetzel *et al.*, 1992), silicapture PCR (Malinowsku, 1997) a print-capture PCR (Olmos *et al.*, 1996). Navzdory tomu, že všechny tyto

metody byly úspěšné při použití nízkého titru, žádný z těchto protokolů není v praxi používán (LLÁCER, 2003).

3.3.5 Ochrana

Problém šarky švestky ve velké míře doléhá nejen na ovocnáře a školkaře, ale i drobné pěstitele a producenty slivovice, hlavně na Moravě. Je nutné zmínit, že jednou virem nakažené stromy již nelze žádnou známou metodou léčit. Tudiž jsou nutná preventivní opatření. Jednou z nejdůležitějších možností ochrany je zdravý výsadbový materiál. Pěstování viruprostého materiálu je velice důležité. Systém certifikace a produkce viruprostých (VF) školkařských výpěstků byl v České republice zaveden v roce 2000. Použití insekticidů je úspěšné pro hubení mšic, ale nezabrání přenosu viru na rostlinu (POLÁK, 2010).

Problém šarky je u broskvoní v hlavních pěstitelských zemích vyřešen. Ukazuje se, že investovat do bezvirózních, *in vitro* rozmnožovaných podnoží se vyplatí, stejně jako dodržení bezpečné vzdálenosti od starších, často zamořených výsadeb peckovin (LITSCHMANN *et al.*, 2008).

Vzhledem k velkému rozšíření šarky švestky na českém území byl ve VŠÚO Holovousy s.r.o. založen pokus zaměřený na hodnocení odolnosti netransgenních odrůd slivoně po umělé infekci PPV (PAPRŠTEJN *et al.*, 2015).

3.3.6 Rezistentní odrůdy

Jednotlivé kategorie vztahu mezi hostitelem (rostlinou) a patogenem je možno charakterizovat takto:

Imunita: Patogen nemůže rostliny infikovat. Po inokulaci patogen není schopen se v rostlině množit a šířit (non-host).

Rezistence: Je velice relativní. Rostlina může být infikována, ale vir má omezené množení i šíření. Rezistence je kvantitativní a velmi závislá na odrůdě.

Náchylnost: Patogenu se v rostlinných buňkách daří, množí se, dosahuje vysoké koncentrace na úkor produktivity a kvality rostliny. Rostlina reaguje silnými příznaky na listech i plodech. Náchylnost je relativní. Protiklady jsou odolnost a rezistence.

Tolerance: Tyto rostliny tolerují nepříznivé důsledky nákazy. Infekce v tolerantních rostlinách probíhá podobně jako v rostlinách náchylných. Virus se množí a šíří, ale symptomy jsou slabé a nedochází k výraznému snížení kvality plodů a výnosu.

Hypersenzitivita: Extrémní náchylnost na virus PPV. Tato náchylnost způsobuje v důsledku přemnožení patogenu nekrotizaci infikovaných buněk nebo i celých rostlin. V důsledku odumírání je extrémně těžké prokázat přítomnost patogenu. V případě nekrotizace není již možné šíření viru. O hypersenzitivitě můžeme mluvit jako o absolutní náchylnosti a protikladu imunity. S jistým rizikem ji můžeme využít i v praxi, ale pouze za určitých podmínek. Hypersenzitivita bohužel ve většině případů není úplná, a tehdy se jedná o silnou náchylnost. Hypersenzitivita bývá také překonána slabě patogenními kmeny viru a v tom případě dochází k silné náchylnosti odrůdy (PAPRŠTEJN *et al.*, 2015).

3.3.7 Projekt SharCo

Jedná se o koncept kombinující profylaktická a genetická řešení k prevenci či omezení šíření choroby šarka švestky. Do projektu spadá celý proces od výsadbového materiálu (sazenic, štěpů, odkopků) až po celkovou produkci ovocného sadu. Projekt se zabývá všemi zúčastněnými stranami, službou na ochranu rostlin, školkaři, pěstiteli i producenty ovoce. Projekt má relevantní výsledky, mezi které patří řídicí pokyny a směrnice pro pěstování, rezistentní odrůdy, optimalizované průzkumy i detekční metody a nástroje (Web Sharco: The SharCo project [online], 2012).

3.4 Fytoplazma ESFY

Fytoplazmy jsou prokaryotní organismy bez pevné buněčné stěny, které není možné kultivovat.

3.4.1 Historie

Žloutenky rostlin byly popisovány už velmi dávno. Jedny z prvních zmínek o žloutence aster můžeme najít již na počátku devatenáctého století. Původně se myslelo, že příčinou této choroby budou viry, z důvodu neschopnosti kultivace stejně jako bakterií nebo hub. Byly přenášeny hmyzem, tudíž jejich tehdy známá biologie byla do velké míry shodná s velkou částí tehdy známých rostlinných virů. Zlomovým rokem pro výzkum fytoplazem byl rok 1967, kdy byly pozorovány v lýku aster pomocí elektronového mikroskopu, oválné buňky podobné živočišným mykoplazmatům (NAVRÁTIL *et al*, 2008).

Fytoplazmy byly dříve nazývány mykoplazmám podobné organizmy (mycoplasma-like organisms - MLOs) (KÚDELA, 1998).

Jedním z důvodů dlouho trvajících poznávání fytoplazem byla neschopnost *in vitro* kultivace, ale také nesnadno proveditelný vektorový přenos. Poznávání také velice komplikoval fakt, že fytoplazmy mají dva zcela rozdílné hostitele, kterými jsou rostliny a hmyzí vektor. V době nerozvinutých molekulárních technik bylo velmi obtížné přiřadit k sobě vektor, fytoplazmu a chorobu. Posléze se ukázalo, že většina chorob popisovaných před rokem 1967 jako bezsemennost, proliferace, virecence, fylodie nebo stolbur byly způsobeny fytoplazmami. Veliký převrat se uskutečnil v 90. letech 20. století, kdy aplikace molekulární hybridizace, RFLP, PCR a sekvencování, umožnily molekulární charakteristiku jednotlivých izolátů fytoplazem, exaktně přiřadit hostitele k fytoplazmám, příznakům a vektorům. Tím byl dán základ pro diagnostiku fytoplazem a zároveň to umožnilo stanovení genetické příbuznosti a jejich taxonomickou klasifikaci. Na začátku devadesátých let minulého století se podařilo získat první informace o genomu fytoplazem. Analýzy se soustředily především na konzervativní úsek

16S rDNA, který byl již dříve používán pro klasifikaci bakterií (NAVRÁTIL *et al.*, 2008).

3.4.2 Charakteristika

V současnosti je známo více jak 800 různých izolátů fytoplazem, které mohou infikovat několik set rostlinných druhů, bohužel mezi ně spadá i široká škála hospodářsky významných plodin (NAVRÁTIL *et al.*, 2008).

Fytoplazmy jsou prokaryotické organismy s pleomorfní stavbou bez buněčné stěny, které přežívají v savém hmyzu, nejčastěji u mer a kříšů. Jsou tak snadno přenášeny do floému na široké spektrum rostlin (KADO, 2010).

Jsou velice podobné mykoplazmám, ale na rozdíl od nich se velmi často vyskytují ve vláknitých a větvených formách. Fytoplazmy se obligátně vyskytují v sítkovicích rostlin a způsobují více než 300 rostlinných chorob (KÚDELA, 1998).

Vzácně mohou osidlovat původní a parenchymatické buňky lýka cévnatých rostlin, dále je možné fytoplazmy nalézt ve střevech, hemolymfě, slinných žlázách a dalších orgánech hmyzu sajícího rostlinné šťávy. U hmyzích hostitelů mohou způsobit předčasnou mortalitu (NAVRÁTIL *et al.*, 2008).

Fylogenetická sekvenční analýza 16S rDNA prokázala, že fytoplazmy tvoří monophyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes*. Na základě 16S rDNA sekvenčního srovnání bylo klasifikováno 15 skupin (domnělých druhů) fytoplazem (KADO, 2010).

Mezi charakteristické znaky *Candidatus Phytoplasma* patří jedinečná sekvence 16S rRNA genu - CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT. Obsah C a G bází dosahuje u fytoplazem 23 až 29 %. Velikost chromozómu se pohybuje od 630 do 1350 kbp. UGA u fytoplazem funguje jako stop kodon. Membrány fytoplazem jsou velice citlivé na hypotonické prostředí, oproti tomu jsou resistantní k digitoninu. Jednotlivé druhy rodu *Candidatus Phytoplasma* musí splňovat jisté parametry, mezi které patří sekvenční podobnost (homologie) 16S rDNA se musí rovnat nebo být vyšší než 97,5 %. I přesto, že izoláty splní

předešlou podmínku, mohou se lišit ve fytopatologických (symptomy, hostitelská specifika), biologických (liší se hmyzím vektorem nebo okruhem hostitelů) nebo molekulárních (velikost chromozómů) charakteristikách a v tom případě je nutné je taxonomicky odlišit (NAVRÁTIL *et al.*, 2008).

3.4.3 Fytoplazma ESFY

European Stone Fruit Yellows Phytoplasma v česku známá jako Fytoplazma Evropské žloutenky peckovin je karanténním onemocněním rozšířeným na území Evropské Unie. Evropská žloutenka peckovin je způsobena patogenem *Candidatus Phytoplasma prunorum* (OSLER *et al.*, 2016).

Evropská žloutenka peckovin je jedním z nejvýznamnějších faktorů bránících úspěšnému pěstování meruněk a broskvoní v centrální Evropě. Phytoplasma ESFY značně redukuje množství stromů ve výsadbách a komplikuje zdravou produkci školkařského materiálu. Přenos a šíření patogenu je většinou proveden pomocí hmyzího vektoru (NEČAS *et al.*, 2012).

Další možností šíření fytoplazmy ESFY je vegetativní množení. Rouby i očka jsou vysoce infekční při odběru ve všech ročních obdobích. Hmyzím vektorem je převážně *Cacopsylla pruni* Scopoli. K přenosu dochází oběma směry mezi podnoží a štěpovanou odrůdou (NEČAS *et al.*, 2008).

Nejvýznamnějšími hostiteli ESFY jsou meruňky (*P. armeniaca*), broskvoně (*P. persica*) a japonské slivoně (*P. salicina*). Dalšími přirozeně infikovanými hostiteli jsou myrobalán (*P. cerasifera*), mahalebka (*P. mahaleb*), briaconská meruňka (*P. brigantina*), slivoň bojarská (*P. bokhariensis*), trnka (*P. spinosa*), švestka domácí (*P. domestica*), třešeň (*P. avium*), višeň (*P. cerasus*), *P. simonii*, *P. orthosepala*, *P. cerasifera* x *P. munsoniana*, *P. subcordata* a *P. besseyi* x *P. hortulana*. Bylo prokázáno, že ESFY může být přenesena pomocí hmyzího vektoru, nebo roubováním na mnohem širší škálu hostitelů, do které patří bobkovišeň lékařská, střemcha obecná, višeň plstnatá, slivoň obecná a mnoho dalších (KOCOUREK, 2015).

Výskyt této choroby byl zaznamenán ve většině evropských zemí. Na území Severní Ameriky jsou peckoviny napadány geneticky odlišnými druhy fytoplazem spadajících do skupiny X diseases. Tyto fytoplazmy bývají příčinou náhlého odumírání. Jsou známy pod názvem western X diseases. V současnosti patří mezi ekonomicky nejvýznamnější onemocnění peckovin. Evropská žloutenka peckovin napadá převážně meruňky a broskvoně. Evropská žloutenka peckovin na území České republiky velice komplikuje jak dopěstování školkařského materiálu, tak i situaci v produkčních výsadbách (NEČAS *et al.*, 2008).

V případě infekce fytoplazmou ESFY dochází k odběru zásobních a růstových látek jako jsou sacharóza, IAA a další. To vede k růstovým změnám. Tyto změny jsou závislé na hostitelské rostlině. Patogen se hromadí v sítkovicích rostlin, což má za následek pozastavení translokace látek v rostlině. Fytoplazma může být příčinou zelenání okvětních lístků, což způsobuje syntéza chlorofylu v těchto částech rostlin. Jedná se o jednu ze známých poruch metabolismu rostlin napadených touto chorobou. Může také dojít k prodloužení květních stopek do neobvyklých délek 2-7cm. Častým jevem jsou také fylodie (přeměněné květní orgány v list) (NEČAS, KRŠKA, 2006).

Bylo prokázáno, že semena meruněk infikovaných ESFY mají velmi nízkou životnost (21,6 %) a téměř žádnou klíčivost (9,4 %) (NEČAS *et al.*, 2008).

Systematicky řadíme '*Candidatus* phytoplasma prunorum' do skupiny:

Bacteria: Tenericutes: Mollicutes: Phytoplasmas.

U většiny hostitelů z rodu *Prunus* ESFY nezpůsobí úhyn, ale výjimku tvoří broskvoně a meruňky, u kterých dojde k úhynu většinou během 12-24 měsíců po objevení prvních symptomů (HARRISON *et al.*, 2008).

Evropská žloutenka peckovin je příčinou zásadních ztrát zapříčiněných vysokou úmrtností broskvoní, meruněk a japonských slivoní (CIEŠLIŇSKA, 2011).

3.4.4 Symptomy a projevy

Příznaky jsou velice různorodé. Odvíjejí se od rostlinného druhu a kmene patogenu. Mladé stromky jsou infikovány systematicky a rychle uhynou během jednoho až dvou let. V případě stromků starších pěti let, jsou symptomy nejdříve lokalizovány na nižších větvích, ale rozšíří se do celé koruny a celé stromy uhynou velmi rychle (AGRIOS, 2005).

Mezi nejčastější symptomy ESFY, dříve známé jako ACLR, (Apricot Chlorotic Leaf Roll) u meruněk patří svinutka listů, růstová deprese, barevné diskolorace, ať už žloutnutí celých listů nebo části listové čepele, předčasný opad plodů i listů. Může také docházet k odumírání kosterních větví, případně celé koruny. Oproti tomu u broskvoní se choroba kromě svinutky projevuje červenáním listů o různé intenzitě, také růstovou depresí a předčasným opadem listů od báze výhonu. Byly zaznamenány také případy, kdy u peckovin došlo k zbytnění nervatury, předčasnému kvetení i deformaci plodů (NEČAS *et al.*, 2008).

U infikovaných meruňkových stromů se objevuje vyšší citlivost na poškození mrazem a dochází k potlačení dormance. Broskvoně často na infekci reagují předčasným žloutnutím nebo červenáním listů, svinováním listů, metlovitostí výhonů a jejich odumíráním (KOCOUREK, 2015).

Symptomy jsou závislé na předčasném otevření pupenů a olistění v pozdní zimě nebo brzkém jaře. Listy zůstávají na stromech déle než je obvyklé a nové pupeny se otvírají i v mrazivých teplotách. Plody na infikovaných stromech jsou menší, mohou být hrbolaté a odpadávat předčasně. Ovocná dužina je nahnědlá a houbovitá v okolí prohlubně. Na kůře infikovaných stromů se mohou rozvést nekrotické oblasti, které se v příčných částech mohou jevit jako tenké oranžové proužky nebo silné hnědé pásy (AGRIOS, 2005).

3.4.5 Ochrana a přenos

Přenašečem ESFY je mera trnková *Cacopsylla pruni*. Podíl infikovaných mer evropskou žloutenkou peckovin se v našich podmínkách pohybuje okolo 25 % (KOCOUREK, 2015).

U mery trnkové je možný také transovariální přenos (TEDESCHI *et al.*, 2006).

U této mery je zpravidla jedna generace za rok, dospělý jedinec má velikost cca 2,4 – 2,9mm. Přezimuje především na jehličnanech, převážně na smrku (*Picea*). Identifikačním znakem této mery jsou kroužkovitá křídla tmavě hnědé barvy. Na konci února dochází k migraci mer z jejích zimovišť do ovocných výsad. Vajíčka kladou na spodní stranu listů až do začátku května. Vajíčka mají citronový tvar a bílou barvu. Nymfy jsou pozorovány od druhého týdne dubna až do začátku července. Již dospělí jedinci pak migrují ze sadů na volně rostoucí peckoviny a zpět na zimoviště kde jsou od srpna do února. Bylo dokázáno, že mera se stává infekční po 7 dnech sání na olistěné dřevině (KRŠKA, NEČAS, 2005).

Dalším významným přenašečem je křísek trnkový (*Fiebriella florii*) (NEČAS, KRŠKA, 2006).

Nejčastěji používanou metodou ochrany je využití šlechtění a rozmístění rezistentních odrůd a primárně kontrola hmyzího vektoru. Pro, dlouhověkové stromy se ukázala použitelná i varianta tetracyklických antibiotik. Bohužel je velice finančně náročná (HULL, 2009).

3.5 Diagnostika

K diagnostice fytoplazmy ESFY se většinou využívají molekulární metody jako například PCR (HULL, 2009).

Diagnostika fytoplazem je postavena na zjištění přítomnosti charakteristických buněk patogenu v hostitelských buňkách, to je na výsledcích testů patogenity (KÚDELA *et al.*, 2002)

3.5.1 Detekční metody:

Biologické testy na indikátorech

Fluorescenční mikroskopie

Elektronová mikroskopie

Sérologické metody

Molekulární metody

Kvantitativní PCR

RFLP analýza

3.5.2 Molekulární metody

Do molekulárních metod řadíme polymerázovou řetězovou reakci (PCR), hybridizaci, sekvencování a délkový polyformismus restrikčních fragmentů (RFLP). U fytoplazmy ESFY je nejčastěji používaná metoda PCR spolu s RFLP analýzou. Je také možné porovnat produkt PCR s příslušnými sekvencemi daného organismu s databází NCBI. Profesor Seemüller (2007, osobní sdělení) poukázal, na fakt že diagnostika fytoplazmy ESFY je jednou z nejobtížnějších, spolu s nejvyšším počtem nespecifických a falešně pozitivních reakcí (NAVRÁTIL, FIALOVÁ, 2008).

3.5.3 PCR

Tato technika je velice citlivá, ale s přihlédnutím k nízkému titru fytoplazem je zapotřebí její citlivost ještě zvýšit, k tomu je používáno nested-PCR, kdy amplifikační produkt první reakce slouží jako templát pro následnou amplifikaci. Určitou nevýhodou nested-PCR je riziko kontaminace a z toho plynoucí riziko falešně pozitivních výsledků. Většinou je prvním stupněm PCR tzv. direct-PCR, při níž se obvykle používají primery P1/P7, které amplifikují 16S-23S rDNA o délce 1800 bp. Z důvodu zvýšení citlivosti a odstranění inhibičních látek se musí naředit sterilní destilovanou vodou a amplifikuje v nested-PCR s vnitřními primery. U nested-PCR se užívají různé kombinace

primerů, podmínkou je, umístění druhého páru vnitřních primerů uvnitř produktu PCR získaného první amplifikací. Pro odhalení falešně pozitivních reakcí je zapotřebí výsledek detekce PCR potvrdit nebo vyvrátit pomocí RFLP analýzy produktu nebo sekvencováním. U ESFY je nejčastěji používáno PCR s primery fU5/rU3 nebo fAT/rPRUS nebo nested-PCR primery R16F1/R0 a R16F2/R2 (NEČAS *et al.*, 2008).

3.5.4 ELISA

Imoenzymatický test ELISA je v dnešní době nejrozšířenějším laboratorním testem. ELISA je zkratkou anglického názvu Linked Immuno Sorbent Assay. Test ELISA funguje na principu antigen-protilátka. Antigenem je zde protein viru. Každá bílkovina tedy i protein viru, je schopná v těle teplokrevného živočicha vytvořit specifické protilátky. Nejčastěji jsou k tomuto účelu používání králíci a myši. Vybranému zvířeti se injektuje purifikovaný virus a po několika týdnech se jim odebere krev. Z jejich krve se poté se izolují imunoglobuliny, které jsou používány po přečištění jako protilátky pro provedení samotného testu. Tyto protilátky zředěné v karbonát-bikarbonátovém pufru se nejprve navážou na stěny jamek mikrotitrační desky. Po promytí se do titračních jamek pipetuje antigen, tedy vzorky testovaných rostlin homogenizované v extrakčním pufru. Antigen se nechá navázat na protilátky vázané na stěnách desky, poté se rostlinné šťávy důkladně vymyjí. Dále je nanesen konjugát, což jsou protilátky konjugované s enzymem alkalickou fosfatázou. Tento konjugát se nechá navázat na antigen. Konjugát se nenaváže na nic jiného než na cílový antigen, v tomto případě virus. Pokud se tedy nevyskytuje žádný virus, je konjugát odmyt v následujícím kroku. Na závěr je přidán bezbarvý substrát pro alkalickou fosfatázu, který je enzymaticky štěpen na žlutý produkt (KOMÍNEK, 2010).

3.5.5 Další diagnostické metody

Elektronová mikroskopie

Pro diagnostiku PPV pomocí mikroskopu je využíván TEM-transmisní elektronový mikroskop. Virové částice šarky švestky jsou menší, než vlnová délka světla proto je nutné použít právě elektronový mikroskop. Transmisní elektronový mikroskop využívá vysokonapěťový proud elektronů (vlnová délka 4 pikometry) ve vakuu. Svazek elektronů emitovaný katodou a usměrněný magnetickými čočkami prochází přes velmi tenký vzorek v podobě ultratenkého řezu o síle 30 -60nm. Další možností je vzorek uchycený na niklové nebo měděné mřížce potažené tenkou vrstvou formvarové membrány. Pro lepší viditelnost používáme negativní barviva např.: molybdenan amonný nebo uranyl acetát. Svazek elektronů přenáší informace o vnitřní struktuře vzorku. Je přenesen a zachycen na fotografickou desku, fluorescenční obrazovku nebo na světlo-citlivý senzor u CCD kamery. Pokud je zapotřebí ještě citlivější diagnostiky využívá se imunisorpční elektronová mikroskopie-ISEM. Dojde při ní k obklopení virových částic navázanými protilátkami. Díky tomu jsou virové částice zvýrazněny. Jsou lépe viditelné a nemůže dojít k záměně s jiným virem o stejné velikosti a tvaru. Stanovení se stává specifickým (KOMÍNEK, 2010).

RFLP analýza

RFLP neboli Restriction Fragment Length Polymorphism tato analýza slouží k rozlišení jednotlivých skupiny a podskupiny fytoplazem. Amplifikované segmenty fytoplazmové DNA se naštěpí díky restriční endonukleáze. Tyto enzymy štěpí DNA ve specifických místech na fragmenty o různých délkách. Poté je prováděna jednosměrná elektroferáza, která separuje naštěpené produkty na agarových gelech. V těchto gelech mají fragmenty o různých délkách rozdílnou pohyblivost. Při porovnání restričních profilů s kontrolními vzorky nebo při porovnání s literárními údaji je možné vzorek identifikovat (LEE *et al.*, 1998).

Co-PCR

Co-operational amplification je velice citlivou metodu, opírající se o současnou produkci čtveřic primerů. Reakce se skládá ze současné reverzní transkripce dvou rozdílných fragmentů RNA pocházejících ze stejného zdroje. Výsledkem jsou dva páry primerů (OLMOS *et al.*, 2002).

qRT-PCR (real-time PCR) - kvantitativní PCR

Metoda využívá fluorescenčně značených sond, specificky nebo nespecificky vázaných na PCR produkt. Výsledek je určen počtem cyklů nutných k detekci cílové nukleové kyseliny (KOMÍNEK, 2010).

3.6 Synergický efekt směsných infekcí

Synergický efekt je jev, při kterém je kombinovaná infekce silnější, než vliv choroby samotné. Může být způsobován virem ze stejného rodu nebo z rodů odlišných. V minulosti měla velký dopad Ugandská varianta *African cassava mosaic virus* (UgACMV), která způsobila vážnou pandemii manioku v 90. letech minulého století. Zničila ugandskou produkci národní potraviny, manioku, a během let 1992-1997 způsobila ztráty větší než 60 milionů USD. Poté se infekce rozšířila do dalších zemí. Mezi begomoviry ACMV a EACMV (*East African cassava mosaic virus*) byl prokázán synergický efekt, který vede k potlačování silencing AC4 genu ACMV a AC2 genu EACMV (HULL, 2009).

3.7 Interakce mezi viry

Společná infekce dvou nebo více virů může vést k odlišné reakci než při jednoduché infekci pouze jedním virem. Záleží, jestli jsou viry vzájemně příbuzné a infekce probíhala souběžně nebo postupně (HULL, 2009).

3.7.1 Interakce mezi příbuznými viry.

Postupná infekce nebo příbuzné viry mohou vést k potlačení sekundárního viru. Tento jev se nazývá křížová ochrana, která je definována jako ochrana hostitelské rostliny pod nápořem viru, a která chrání rostliny před nákazou blíže příbuznými viry. Například rostliny tabáku infikované slabým PVX jsou imunní proti pozdější silné infekci tímto virem. A to i v případě, že by infekce proběhla pouze po 5 dnech. Nejsou, ale imunní proti infekci nepříbuzných virů jako jsou TMV a PVY. Tento jev nazývaný také antagonismus nebo interference nastává velmi běžně mezi příbuznými viry. Mnohem lépe se tento jev demonstruje v případě, že první inokulovaný patogen způsobuje velmi slabou systémovou chorobu a druhý způsobuje nekrotická lokální poškození nebo vážné škody. Interference mezi dvěma příbuznými viry může být také demonstrována namícháním dvou virů ve stejném inokulu a inokulací na hostitelskou rostlinu, která ukáže charakteristická poškození jednoho nebo obou virů. Kmeny *Alfalfa mosaic virus* (AMV) se liší v hromadění těl, které jejich části staví do infikovaných buněk. Byl použit elektronový mikroskop k ověření působení křížové ochrany mezi dvěma kmeny AMV. Když byl napadající kmen inokulován stejně jako ochranný kmen nebo v krátkém časovém období po něm (do 4 hodin), oba typy byly pozorovány nahromaděné vedle sebe ve stejných buňkách. Když byl použit delší interval mezi inokulacemi obraného a napadajícího kmene (okolo 7 hodin) byly tyto dva kmeny nalezeny v oddělených částech cytoplasmy stejných buněk a po 10 hodinách v odlišných buňkách. Až když byla křížová ochrana kompletní a vyhodnocena zpětnou inokulací na indikátor v hostitelské rostlině nebylo pozorováno hromadění těl. Vysvětlením tohoto jevu je RNA silencing, jev vyvolaný virovou infekcí. Koinokulace může vést ke konkurenční ochraně, ve které dochází k snižování rychlosti infekce bránícího viru, který nehromadí nebo vyvolává příznaky u hostitelské rostliny (HULL, 2009).

V roce 2008 byl proveden pokus o aplikaci křížové ochrany i na šarčku švestky. Z izolátu PPV-BOR3 byly vyselektovány další varianty a byl získán izolát PPV-T12. Tento izolát na rostlinách způsobuje jen velmi slabé symptomy choroby. Předběžné výsledky prokázaly, že rostliny *Prunus persica* odrůdy

GF350, které byly uměle infikované izolátem PPV-T12, byly ochráněny před následnou infekcí velmi silným virulentním izolátem PPV-D (RAVELONANDRO *et al.*, 2008).

Na transgenní švestky *Prunus domestica* klonu C5 byl uměle naočkován virus PPV-Rec, PPV-Rec spolu s *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), PPV-Rec spolu s Prune Dwarf virus (PDV) a PPV-Rec spolu s ACLSV a PDV. Rostliny, které nebyly naočkovány, sloužily jako kontrolní rostliny. Rostliny byly pěstovány ve volné půdě po dobu pěti let. Byly na nich hodnoceny viditelné symptomy, dále byly hodnoceny pomocí DAS-ELISA a RT-PCR. Slabé symptomy v podobě difúzních skvrn a kroužků se objevily dva roky po inokulaci na listech uměle nakažených rostlin PPV-Rec, PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV a PPV-Rec + ACLSV + PDV. V průběhu následujících tří let bylo pozorováno slábnutí symptomů PPV. V roce 2007 byly velmi slabé symptomy PPV pozorovány pouze na několika málo listech a 70 % C5 stromů neprokazovalo žádné symptomy PPV. Přítomnost PPV byla potvrzena testy ELISA, ISEM a RT-PCR. Nebyly pozorovány žádné rozdíly v symptomech mezi PPV-Rec a kombinacemi PPV-Rec + ACLSV, PPV-Rec + PDV a PPV-Rec + ACLSV + PDV. Nebyly pozorovány žádné symptomy ACLSV na rostlinách infikovaných kombinací ACLSV s PPV-Rec a PPV-Rec + ACLSV + PDV v průběhu let 2004 až 2007, ale přítomnost patogenu byla prokázána pomocí ELISA a RT-PCR. Synergický ani antagonistický jev nebyl pozorován u ACLSV a PPV-Rec. Žádné symptomy PDV nebyly pozorovány v průběhu let 2004-2007. Přítomnost PDV nebyla potvrzena testem ELISA a test přítomnosti PDV pomocí RT-PCR na transgenních švestkách byl nejistý u většiny infikovaných stromů v letech 2006 a 2007. Tyto výsledky ukazují na možnost antagonismu mezi PPV-Rec a PDV, oproti tomu nebyl prokázán ani synergismus ani antagonismus mezi PPV-Rec a ACLSV (POLÁK *et al.*, 2008).

3.7.2 Interakce mezi nepříbuznými viry

U některých virových kombinací je tu kompletní závislost jednoho viru na druhém pro jeho replikaci. (HULL, 2009).

Společná infekce tabákových rostlin PVX a PVY je charakteristická silnými nekrózami na infikovaných listech. Listy vykazují synergický efekt 10krát silněji infekce PVX, ale jen v případě infekce PVY. Studie prokázala replikaci obou virů ve stejných buňkách, zvýšená produkce PVX je způsobena zvýšenou produkcí viru každou buňkou spíše než zvýšením počtu buněk podporujících PVX replikaci. Hladina PVX (-) RNA vláken se zvyšuje neúměrně k (+) RNA vláknům v dvojité infikovaných tkáních. To naznačuje, že synergie vyžaduje střídání dvou RNA vláken s opačnou polaritou v průběhu replikace viru. To je způsobeno aktivitou HC-Pro produktu PVY, což je potlačovatel tlumení RNA (HULL, 2009).

3.7.3 Interakce ostatních mikroorganismů

Virový patogen může způsobit rezistenci proti houbové, bakteriální či jiné chorobě. Například *Phytophthora infestans* se rozvíjí mnohem pomaleji na bramborových rostlinách infikovaných viry. V případě nákazy TMV u hypersenzitivních kultivarů tabáku došlo k vyvolání systémové, trvalé rezistence proti *Phytophthora parasitica*, *Peronospora parasitica* a *Pseudomonas tabaci*. Na druhou stranu mohou virové infekce zvýšit citlivost k houbovým onemocněním rostlin. Například rostliny cukrové řepy rostoucí v polních kulturách infikované *Beet mild yellows virus* mají vysokou citlivost k *Alternarii*. Houbové choroby také mohou způsobit náchylnost k virovým chorobám. Například listy fazolí pinto byly silně infikovány houbou *Uromyces phaseoli* nejdříve na polovině listů a později se projevila TMV na celé ploše listu (HULL, 2009).

Při interakci žloutenky aster a OBDV- *Oat Blue Dwarf virus* ze skupiny *Tymoviridae* v *Macrosteles Quadrilineatus Forbes* bylo pozorováno snížení přenosové rychlosti obou patogenů (WEINTRAUB, JONES, 2010).

Byl také proveden výzkum vlivu kombinované inokulace *Rhizobacterie* a arbuskulární mykorhizní houby na rostlině infikované cytoplazmou. Bylo pozorováno šíření fytoplazmy a její životnost uvnitř *Chrysanthemum carinatum*. Kombinovaná inokulace *Glomus mosseae* BEG12 a *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif vedla k rezistenci proti některým fytoplazmatickým infekcím (okolo 30%), zpoždění projevů symptomů na nerezistentních odrůdách, zlepšení růstu nadzemních částí infikovaných rostlin (o 68,1 %) a změně morfologie kořenů (zvýšení počtu kořenových špiček o 49 %, zvýšení stupně větvení o 82,8 %). Kombinovaná inokulace dvěma prospěšnými mikroorganismy neovlivnila množení ani životnost fytoplazmy aster v testovaných rostlinách. Na naočkovaných rostlinách byla morfologie fytoplazmy typická pro stárnoucí buňky. Změny kořenového systému na dvojité inokulovaných rostlinách způsobily aktivnější a efektivnější kořenový systém. Výsledkem byla 30 % rezistence proti fytoplazmě a zvýšení tolerance k onemocnění v podobě zpoždění symptomů a zlepšení růstu naočkovaných rostlin. Tolerance způsobená kombinací mikroorganismů nebyla pravděpodobně způsobena jen zlepšeným růstem rostliny, ale může být i spojována se změnou hormonální rovnováhy v očkovaných rostlinách (D'AMELIO, 2011).

4 Materiál a metodika

4.1 Charakteristika stanoviště

Vybrané stanoviště, kde byl pokus prováděn, je na pozemku Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Lednici. Pozemek se nachází v nadmořské výšce 176 m.n.m. Průměrná roční teplota v letech 1961-2014 zde je 10,11 °C. Údaje byly získány z meteorologické stanice v Lednici, která se nachází na pozemku Mendelea.

Oblast Lednice podle Quittovy klasifikace spadá do oblasti T4. Charakteristickými znaky jsou velmi dlouhá, velmi teplá a velmi suchá léta. Přejídná období jsou krátká, s mírně teplými jary a podzimy. Zimy jsou na tomto území krátké, mírně teplé, suché až velmi suché s velmi krátkým trváním sněhové pokrývky.

Jedná se o teplou makrooblast, kde suma aktivních teplot je větší než 2800 °C, podoblast je převážně suchá s hodnotou klimatického ukazatele zavlažení mezi 150-100mm. V tomto okrsku je T_{\min} nad -18 °C, proto je tento okrsek ideální pro přezimování kultur. Výskyt absolutního minima pod -20 °C se zde vyskytuje pouze 1 až 2 krát za 10 let. Ovocné stromy s dřívějším nástupem vegetace, zejména meruňky, jsou zde ve velkém nebezpečí poškození během střídavého výskytu teplých a mrazových období na konci zimy (ROŽNOVSKÝ, LITSCHMANN, 2011).

4.2 Rostlinný materiál

Pro pokus byly použity podnože:

- M-LE-1
- Myrobalán 29 C
- St. Julien A

Podnože byly odebrány v ovocném sadu Ústavu ovocnictví v areálu ZF v Lednici. Popis vybraných podnoží je uveden v literární části v podkapitole 4.2.

Jako inokulum PPV byly použity následující odrůdy broskvoní. Tyto odrůdy jsou popsány v podkapitole 4.1.1:

- Suncrest
- Daimond princess
- Miss Italia

Jako inokulum ESFY byly použity následující odrůdy meruněk, tyto odrůdy jsou popsány v podkapitole 3.1.1:

- Vestar
- Saldcot
- Poyer

Všechny matečné rostliny, ze kterých byla odebrána inokula, byly molekulárně testovány jak na výskyt PPV, tak ESFY.

4.3 Založení praktické části

V roce 2014 byl na Ústavu ovocnictví Zahradnické fakulty v Lednici, na MENDELU založen pokus, zkoumající synergický a antagonický vliv viru PPV a fytoplazmy ESFY. V průběhu I. etapy byl pokus rozdělen na inokulaci fytoplazmou ESFY a virem PPV. Nejdříve byly na zvolené podnože naočkovány zdroje patogenů.

Bylo naočkováno 40 kusů od každé podnože. Celkem bylo naočkováno 720 kusů rostlin. Celé očkování probíhalo v srpnu 2014 ve školce na Mendeleu ve volné půdě. Od jara roku 2016 byly rostliny přesazeny do technického izolátu, kde byly vizuálně hodnoceny symptomy obou chorob. V létě roku 2016 byla na rostliny naočkována inokula dalších chorob. Na rostliny s již naočkováním ESFY

bylo naočkováno PPV a na rostliny s již dříve inokulovaným PPV bylo naočkováno ESFY.

V dalších letech budou rostliny testovány pomocí metod ELISA, PCR a nadále vizuálně hodnoceny symptomy obou chorob.

4.4 Zpracování výsledků

V průběhu roku 2016 probíhala vizuální hodnocení jednotlivých symptomů na infikovaných rostlinách. Hodnocení symptomů PPV probíhalo pomocí čtyřstupňové stupnice intenzity

- 0...absence příznaků
- 1...příznaky slabé intenzity (symptomy se vyskytují jen na jednom nebo několika listech)
- 2...příznaky střední intenzity (zřetelné symptomy na více listech)
- 3...příznaky silné intenzity (symptomy pokrývají většinu listové plochy a většiny listů na rostlině)

Hodnocení symptomů fytoplazmy ESFY probíhalo pomocí tabulky četnosti symptomů

- SV – svinutka listů
- ŽL – žloutenka listů
- PO – předčasný opad listů
- CHSV – chlorotická svinutka listů
- BS – bez symptomů

Vizuální hodnocení probíhalo od začátku května 2016 do začátku září 2016. Poté probíhalo pozorování ukončení vegetačního období.

4.5 Výsledky

Výsledky získávané v průběhu pozorování v roce 2016 byly zaznamenávány do tabulek deníku pro hodnocení symptomů viru PPV a fytoplazmy ESFY. Z deníku byly přepsány do programu Microsoft Office Excel 2013. Poté byly tabulky použité k dalšímu zpracování výsledů.

Celý výzkum má předpokládané trvání několik let. Proto v termínu dokončení práce byly k dispozici pouze výsledky pozorování symptomů z roku 2016.

Výsledky pozorování výskytu ESFY byly do velké míry ovlivněny tím, že ve většině případů se první symptomy vyskytují až 3 roky po nákaze. Celkem bylo do technického izolátu umístěno 167 infikovaných rostlin, z toho 41 rostlin naočkovaných inokulem PPV a 126 rostlin naočkovaných inokulem ESFY.

Na počátku sledovaného vegetačního období byla na rostlinách infikovaných ESFY pozorována svinutka listů. Svinutka listů byla pozorovaná v průběhu celého vegetačního období. Z celkového počtu 126 rostlin naočkovaných ESFY v technickém izolátu, se jasné symptomy v podobě svinutky listů objevily pouze na 7 rostlinách. Svinutka byla u rostlin naočkovaných ESFY pozorována vždy pouze na inokulu. U rostlin, na kterých byla naočkována fytoplazma, byl pozorován předčasný opad listů. V dubnu roku 2017 bylo na pěti rostlinách Saint Julien, které byly naočkovány ESFY inokulem Vestar, pozorováno předčasné rašení a poté i předčasné kvetení rostlin.

Svinutka listů se objevila i na 4 rostlinách v technickém izolátu, které byly uměle naočkovány pouze PPV.

Tabulka 1-Průměrný rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnožích St. Julien, M-LE-1, Myrobalán na odrůdách Saldcot a Vestar (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).

Průměrný rozsah symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období						
Datum pozorování:	St.Julien/ Saldcot	M-LE-1/ Saldcot	Myrobalán/ Saldcot	M-LE-1/ Vestar	Myrobalán/ Vestar	St. Julien/ Vestar
číslo stromu	Příznaky	Příznaky	Příznaky	Příznaky	Příznaky	Příznaky
Inokulum	1	BS	BS	BS	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	2	BS	BS	BS	BS	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	3	BS	BS	BS	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	4	BS	BS	BS	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	5	BS	BS	BS	PO	PO
Podnož		BS	BS	BS	BS	PO
Inokulum	6	BS	BS	BS	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	7	BS	BS	BS	BS	PO
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	8	BS	BS	BS	BS	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	9	BS	BS	SV	PO	PO
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	10	BS	BS	BS	BS	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	11	BS	BS	BS	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	12	BS	PO	BS	PO	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Inokulum	13	BS	PO	SV	BS	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	PO
Inokulum	14	BS	SV,PO	BS	PO	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Inokulum	15	SV	PO	BS	PO	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Inokulum	16	BS	BS	SV	PO	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	17	SV	BS	BS	BS	BS
Podnož		BS	BS	BS	BS	BS
Inokulum	18	SV	PO	BS	BS	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	PO
Inokulum	19	BS	PO	BS	BS	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Inokulum	20	BS	PO	BS	PO	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Inokulum	21	BS	PO	BS	PO	BS
Podnož		BS	PO	BS	BS	BS
Poznámka			Pozorovány symptomy PPV			



Obrázek 1- Svinutka listů na listech saldcotu způsobená ESFY v technickém izolátu na MENDELEU.
Zdroj: autor

Symptomy PPV byly v průběhu celého pozorování mnohem lépe a častěji patrné než symptomy ESFY. Z celkového počtu 41 rostlin naočkovaných PPV se symptomy druhého stupně v podobě difuzních skvrn objevily pouze na jedné naočkované podnoži. Symptomy 3. stupně se projevily na 27 infikovaných podnožích. Na inokulech se symptomy 1. stupně objevily celkem na pěti pozorovaných inokulech. Symptomy 2. stupně se projevily na 14 pozorovaných inokulech a symptomy 3. stupně na 17 inokulech. U Saldcotu došlo v rámci technického izolátu k přenosu PPV na několik pozorovaných rostlin, které byly původně naočkovány pouze ESFY.

Nejčastější symptomy na rostlinách infikovaných PPV byly chlorotické skvrny v okolí nervatury. Dále byly patrné i chlorotické kroužky na listech. U rostlin infikovaných PPV hned na počátku vegetačního období byla pozorována *Taphrina deformans*. Symptomy *Taphriny* v průběhu vegetace slábly, až vymizely úplně.



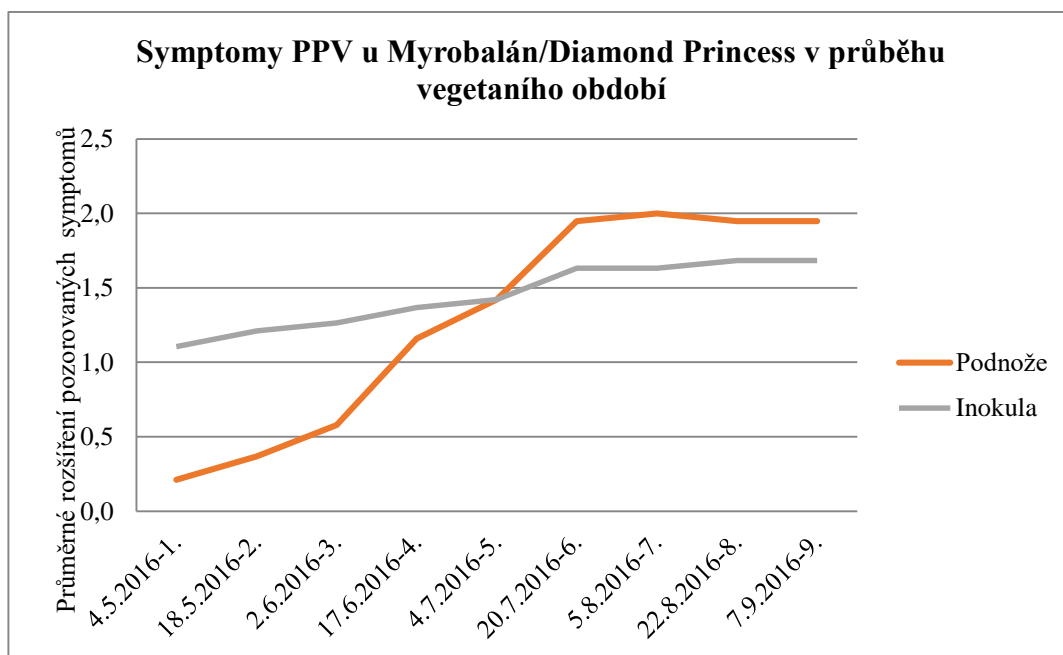
Obrázek 2-Difúzní skvrny na listové ploše Myrobalánu způsobené PPV. V technickém izolátu na MENDELEU. Zdroj: autor

Tabulka 2-Průměrný rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnožích St. Julien,M-LE-1,Myrobalán a odrůdách Suncrest, Diamond Princess a Miss Italia (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).

Průměrný rozsah symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období				
Datum pozorování:		St. Julien/ Suncrest	Myrobalán/ Diamond Princess	M-LE-1/ Miss Italia
Číslo stromu		Příznaky	Příznaky	Příznaky
Inokulum	1	1	1	1
Podnož		0	2	3
Inokulum	2	1	1	0
Podnož		0	2	2
Inokulum	3	1	0	0
Podnož		2	0	2
Inokulum	4	0	1	2
Podnož		3	0	3
Inokulum	5	2	1	2
Podnož		0	1	3
Inokulum	6	3	2	2
Podnož		2	2	3
Inokulum	7	2	2	2
Podnož		3	0	3
Inokulum	8	2	2	2
Podnož		0	2	3
Inokulum	9	2	3	3
Podnož		0	3	3
Inokulum	10	0	3	
Podnož		3	0	
Inokulum	11	2	2	
Podnož		0	0	
Inokulum	12	2	1	
Podnož		0	2	
Inokulum	13	2	2	
Podnož		2	2	
Inokulum	14		2	
Podnož			0	
Inokulum	15		2	
Podnož			2	
Inokulum	16		2	
Podnož			3	
Inokulum	17		0	
Podnož			3	
Inokulum	18		2	
Podnož			2	
Inokulum	19		2	
Podnož			3	
Poznámka:		Pozorovány symptomy Taphriny		

Stupnice intenzity vizuálních příznaků: viz Metodika

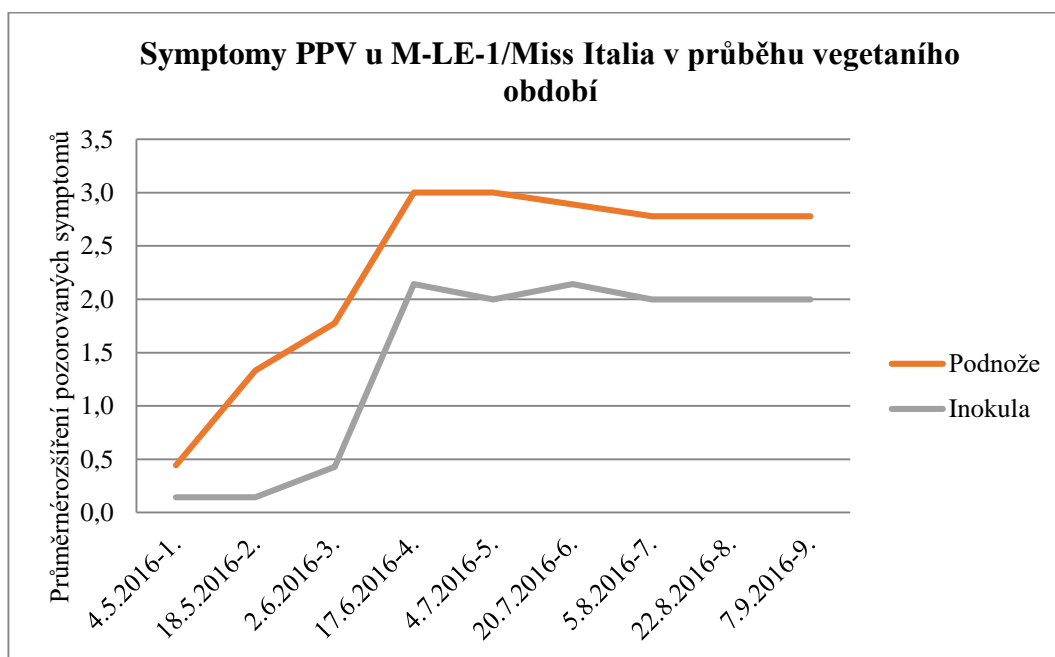
Při vizuálním hodnocení inokula Diamond Princess a podnože myrobalánu byly pozorovány téměř identické symptomy na inokulu v průběhu celé vegetace, a to v podobě chlorotických skvrn na listové ploše. Na podnožích se silnější symptomy u většiny rostlin projeví až na začátku července. Z celkového počtu 19 rostlin myrobalánu, na které bylo naočkováno PPV pomocí diamond princess, se symptomy druhého stupně projeví pouze na jedné sledované podnoži, symptomy 3. stupně se projeví na 12 uměle infikovaných podnožích. Na šesti podnožích se v průběhu sledovaného období neprojeví žádné symptomy PPV. Pouze na 1 inokulu se neprojeví žádné symptomy. Na třech inokulech se projeví pouze symptomy prvního stupně. Symptomy 2. stupně se projeví na 7 inokulech a silné symptomy 3. stupně se projeví na 8 inokulech. Na jedné z infikovaných rostlin se vytvořil i plod, na kterém byly pozorovatelné skvrny, později i nerovnosti, ale došlo k předčasnému opadu plodu, tudíž nebylo možné plod nadále pozorovat. U rostlin myrobalánu naočkovaných PPV inokulem diamond princess, byl termín ukončení vegetace téměř identický.



Graf č. 1-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v technickém izolátu na Myrobalánu s inokulem Diamond Princess během sledovaného období.

Při vizuálním hodnocení podnože M-LE-1 a inokula Miss Italia byly hned při prvním pozorování 4. 5. 2016 patrné symptomy na třech z devíti pozorovaných rostlin.

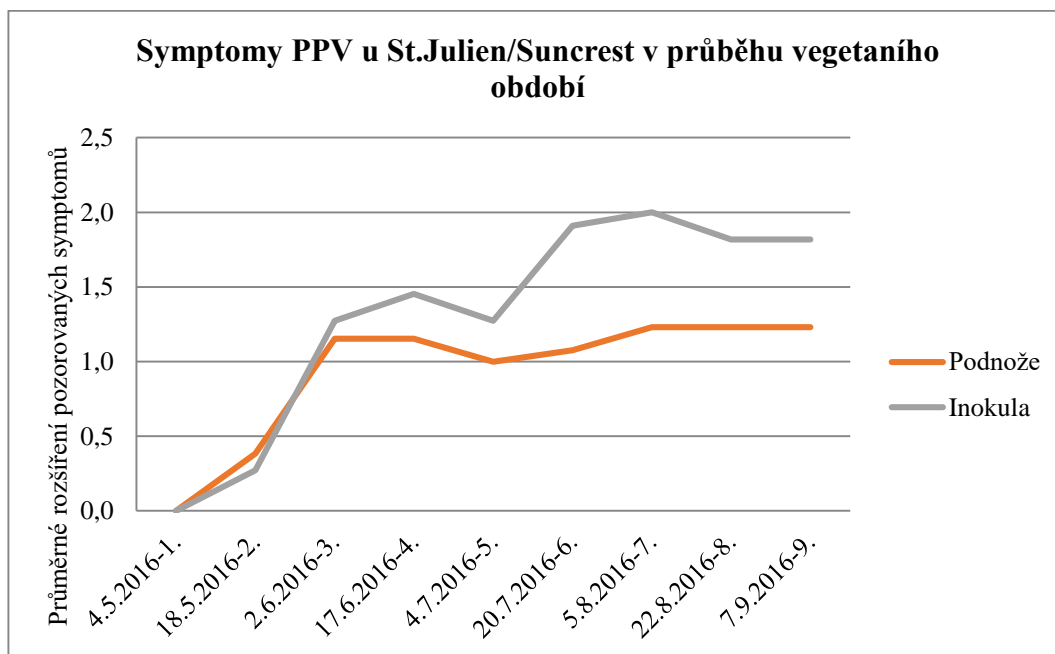
V průběhu sledovaného období byly pozorovány symptomy na všech devíti pozorovaných inokulech Miss Italia naočkovaných na podnoži M-LE-1. Symptomy 3. stupně se v průběhu vegetace ukázaly na všech devíti infikovaných podnožích. Na inokulech se intenzita symptomů zvyšovala v průběhu vegetace. Na počátku vegetačního období byly symptomy PPV pozorovány pouze na 3 z 9 naočkovaných podnožích, ale od termínu 17. 6. 2016 byly symptomy 3. stupně pozorovány na všech 9 pozorovaných podnožích. U všech devíti podnoží došlo k ukončení vegetačního období ve stejném termínu, a to 27. října 2016. U tří pozorovaných inokul došlo k dřívějšímu opadu listů.



Graf č. 2-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v technickém izolátu na M-LE-1 s inokulem Miss Italia během sledovaného období.

Bylo pozorováno 13 podnoží St. Julien, na kterých bylo naočkováno pomocí inokulu Suncrest onemocnění PPV. V průběhu pozorovaného období se symptomy 3. stupně projeví na 6 ze sledovaných podnoží, na dalších 7 sledovaných podnožích St. Julien se neprojeví žádné symptomy PPV. Tři sledovaná inokula zůstala po celou sledovanou dobu bez symptomů. Na dvou

sledovaných inokulech se projevíly symptomy pouze prvního stupně, na třech sledovaných inokulech se projevíly symptomy druhého stupně. Na zbývajících pěti rostlinách byly pozorovány symptomy 3. stupně. Všechny pozorované rostliny St. Julien ukončily vegetační období ve stejném termínu 27. října 2016.



Graf č. 3-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v technickém izolátu na St. Julien s inokulem Suncrest během sledovaného období.

4.6 Diskuse

Diplomová práce byla do velké míry ovlivněna faktem, že podobný výzkum zatím žádné instituce, kromě ústavu ovocnictví na Zahradnické Fakultě Mendelovy Univerzity, neprováděly. K dané problematice tudíž neexistují žádné dostupné literární ani elektronické zdroje, ze kterých by se dal odhadovat výsledek praktické části. Práci také velice ovlivnil fakt, že se praktická část opírá o dlouhodobý projekt a k dispozici byly pouze dílčí výsledky. Pro výzkum byla zvolena metoda pokusu v technickém izolátu. Po pozorování symptomů jednotlivých chorob budou provedeny testy ELISA a PCR k ověření přítomnosti obou patogenů. První symptomy fytoplazmy ESFY se obvykle projevují teprve po 2-3 letech od termínu nákazy, i proto budou použity metody PCR a ELISA. Pokud dojde k synergii takto závažných onemocnění, její dopady na rostliny mohou být ničivé a k úhynu rostlin může dojít velice rychle.

V práci doktora Nečase a kolektivu z roku 2008 bylo prokázáno, že semena infikovaná ESFY ztratila schopnost klíčit. Tudíž vypěstované semenáče by podle této teorie neměly být pozitivní na výskyt fytoplazmu ESFY. Pokud jsou tedy mladé semenáče ochráněny před hmyzím vektorem a přijdou do kontaktu pouze s viruprostými školkařskými výpěstky, nemělo by dojít k interakci fytoplazmy ESFY a PPV na mladých semenáčích už ve školkách. Z tohoto důvodu je vhodné upřednostnit semenáče před vegetativně množenými podnožemi.

Dle Hull (2009), který se ve své práci zabýval mimo jiné i synergismem virů, je možné usuzovat, že vzhledem k různorodosti patogenů nedojde k antagonismu. V průběhu výzkumu byly nejsilnější symptomy PPV pozorovány na podnoži M-LE-1 s inokulem Miss Italia. Oproti tomu průměrně nejslabší symptomy se projevily na Saint Julien naočkovaném pomocí inokulu Suncrest. Zmíněné výsledky jsou konstatovány na základě výpočtu aritmetického průměru hodnot pozorovaných při praktickém pokusu v podmínkách technického izolátu. Lze očekávat, že síla onemocnění ESFY a šarky švestky bude závislá mimo jiné na odrůdě rostliny a tom, zda se jedná o odrůdy rezistentní nebo citlivé ke zkoumaným onemocněním. Glasa ve své práci z roku 2010 uvedl, že velice podstatný je kmen a virulence viru, proto je možné předpokládat, že zkoumaný synergismus a jeho síla bude velice ovlivněn právě těmito vlastnostmi viru. Stejně tak jsou důležité charakteristické vlastnosti fytoplazmy ESFY.

Dle práce D'Amelia z roku 2011 je možné předpokládat, že v případě posílení ochranných schopností rostliny například aplikací Rhizobacterie a arbuskulární mikorhizní houby, by se fytoplazmatické infekce vůbec nemusely projevit a rozvinout. Vůbec by tedy nemuselo dojít k synergismu.

Z práce Weintraub a Jones, (2010) je možné také usuzovat, že v případě interakce PPV a fytoplazmy ESFY uvnitř hmyzího vektoru, dojde k snížení přenosové rychlosti patogenů, tudíž by nemělo dojít k současné infekci oběma patogeny z jednoho hmyzího vektoru, ale není to vyloučeno. Dle Hull (2009) je možné předpokládat, že v případě inokulace ESFY po propuknutí virózy šarky švestky, dojde k zvýšení náchylnosti k fytoplazmatickým chorobám, mimo jiné i fytoplazmy ESFY. Na základě dosavadních výsledků probíhajícího a popsáno

pokusu nebyla shora uvedená teorie potvrzena nebo vyvrácena, nicméně nelze vyloučit jiné závěry v případě pokračování pokusu.

Jak bylo výše uvedeno, symptomy Evropské žloutenky peckovin se projevují až po několika letech od nákazy. Jedním z možných výsledků výzkumu je potvrzení synergie mezi PPV a fytoplazmou ESFY. Pokud existence synergie bude prokázána a dojde k rychlejšímu úhynu infikovaných rostlin, byly by rostliny po dvojité infekci v mnohem větším nebezpečí a pro ovocnáře by se výskyt obou chorob ve výsadbách mohl stát likvidačním. Tím se tento důležitý výzkum může stát prvním krokem ve vývoji detekčních a ochranných metod proti synergickým efektům mezi různorodými patogeny jako jsou vir a fytoplazma.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že v budoucnu je nutné se zaměřit na šlechtění a výsadbu rezistentních odrůd rostlin. Tato metoda by se mohla stát významným nástrojem v boji proti potenciální synergii. Možné využití také může mít použití hypersenzitivních odrůd, kde dochází po infekci k nekrotizaci infikované tkáně a nedochází k následnému šíření patogenu v těle rostliny. V dnešní době je také velice nutné dodržovat dostatečné vzdálenosti od starých výsadeb i solitérních stromů, které mohou být zdrojem nebezpečné nákazy.

5 Závěr

Většina výzkumných pracovišť se specializuje pouze na bakteriologii nebo virologii. První výsledky interakce viru a fytoplazmy by tedy měly být až z dlouhodobého výzkumu na Mendelově univerzitě. Tato problematika je velice závažným tématem dotýkajícím se ovocnictví a ekonomiky v dlouhodobém výhledu. V případě prokázání synergie ESFY a PPV praktickým pokusem, by kvůli nárůstu výskytu těchto onemocnění a navýšení rizika infekcí mohlo v budoucnu dojít k poklesu produkce peckovin v evropských podmínkách se všemi hospodářsko-ekonomickými důsledky, neboť nahrazení této produkce bude velice komplikované.

Cílem praktické části diplomové práce bylo vyhodnocení symptomů na uměle infikovaných rostlinách ve sledovaném období. Vzhledem k dlouhodobému charakteru pokusu jsou v době vypracování diplomové práce dispozici pouze dílčí výsledky.

Obě onemocnění jsou velice nebezpečná a v případě napadení rostlin a rozšíření může dojít k významným škodám. Vzhledem k tomu, jakého věku se meruňky v ČR dožívají, mohou přestárlé a neudržované sady tvořit významný zdroj onemocnění. Tím, že obě zmiňovaná onemocnění jsou přenosná na široký sortiment rostlinných druhů, nehrozí nebezpečí pouze meruňkovým a broskvoňovým výsadbám.

Prokazatelně vyšší teploty posledních let jsou příznivější pro hmyzí vektor. Jak je v práci uvedeno, přítomnost viru a fytoplazmy ve hmyzím hostiteli je možná, současná přítomnost sice může snižovat přenosovou rychlost, ale to neznamená, že rostlina by nemohla být infikována oběma patogeny najednou. Vzhledem k vlastnostem symptomů daných onemocnění je možné, že pozorovatel zpočátku vůbec nezaznamená možnost obou chorob na rostlinách. Zejména v případě laického pěstitele je reálné nebezpečí, že se bude snažit udržet nakažené stromy v sadech a zahradách a ve skutečnosti budou infikované stromy pouze zdrojem obou nákaz.

Vyšší převážně zimní teploty prospívají fytoplazmám. Potenciální možností by byla výsadba hypersenzitivních odrůd, které v případě infekce PPV nekrotizují infikovanou tkáň, tím pádem by nemělo docházet k synergii. Obě onemocnění mají tak markantní dopad na život rostliny, že v případě dvojité infekce a synergického efektu by rostlina nebyla dlouhodobě schopná vegetace.

V budoucnu by se neměla zanedbávat ani možnost veřejné osvěty v oblasti ovocnictví a rostlinolékařství. Přestárlé rostliny v soukromých výsadbách mohou být významným zdrojem nákazy. V případě budování nových školek je důležité dohlédnout na dodržení bezpečných vzdáleností od potenciálních zdrojů nákazy.

6 Souhrn

Hodnocení vzájemného synergismu fytoplazmy ESFY a viru šarky švestky (PPV) u meruněk a broskvoní.

Tato práce se zabývá společným působením *Candidatus phytoplasmy prunorum* a *Plum Pox virus*. Obě choroby jsou celosvětově rozšířené a velice nebezpečné. Jedinou známou ochranou je prevence. Evropská žloutenka peckovin je způsobována *Candidatus Phytoplasma Prunorum*. *Candidatus Phytoplasma Prunorum* je mikroorganismus bez buněčné stěny, který je taxonomicky řazen *Tenericutes* třídy *Mollicutes*. Nemoc šarky švestky je způsobována *Plum Pox virus*. *Plum Pox virus* je mikroorganismus patřící do *Potyviriidae* třídy *Potyvirus*. Na ústavu ovocnictví na Zahradnické fakultě Mendelovi univerzity na MENDELEU v Lednici byl roku 2014 založen dlouhodobý experiment zkoumající interakci fytoplazmy ESFY a PPV. Tento výzkum se zabývá možným synergickým efektem (PPV a ESFY). Symptomy obou chorob byly pozorovány každé dva týdny a zapisovány do tabulky. Jelikož se jednalo o dlouhodobý výzkum, výsledky jsou pouze dílčí.

Klíčová slova: Synergický efekt, křížová ochrana, meruňky, broskvoně, PPV, fytoplasma ESFY

7 Resume

Evaluation of the synergism phytoplasma ESFY and sharka diseases (PPV) in apricots and peaches.

The synergism of *Candidatus phytoplasma prunorum* and *Plum Pox virus* was investigated in this study. Both diseases are globally widespread and extremely dangerous. The only existing protection is prevention. European Stone Fruit Yellows is caused by *Candidatus Phytoplasma Prunorum*. *Candidatus Phytoplasma Prunorum* is microorganism without a cell wall that belongs to group *Tenericutes* and class *Mollicutes*. Sharka disease is caused by *Plum Pox virus*. *Plum Pox virus* is microorganism that belongs to group *Potyviridae* class *Potyvirus*. In 2014 a long-term experiment was founded by Mendel University in MENDELEUM in Lednice. Possible synergic effect between European Stone Fruit Yellows and Sharka disease was researched in this experiment. The experiment is based on observation of plants with double inoculation (PPV and ESFY). Symptoms were observed every two weeks and put in to a table. As it is a long-term experiment only partial results were reached.

Keywords: synergic effect, cross protection, apricot, peach, PPV, phytoplasma ESFY

8 Seznam použité literatury

AGRIOS, George N. *Plant pathology*. 5th edition. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 978-0-12-044565-3.

BAŽANT, Zdeněk. *Pěstujeme broskvoně*. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-7169-518-1.

BAŽANT, Zdeněk. *Pěstujeme meruňky*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0873-6.

CIFRANIČ, P. Marhule. 1. vyd. Bratislava: Priroda, 1986, 115 s.

CIEŚLIŃSKA, Mirosława. LESS COMMON PHYTOPLASMAS INFECTING STONE FRUIT TREES. *Journal of Plant Protection Research* [online]. 2011, 51(4), 435-440 [cit. 2016-04-12]. ISSN 14274345. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=eih&AN=66585121&lang=cs&site=ehost-live>

D'AMELIO, R., G. BERTA, E. GAMALERO, N. MASSA, L. AVINADO, S. CANTAMESSA, G. D'AGOSTINO, D. BOSCO, C. MARZACHI. Increased plant tolerance against chrysanthemum yellows cytoplasma ('Candidatus *Phytoplasma asteris*') following double inoculation with *Glomus mosseae* BEG12 and *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif. In: *Plant pathology* [online]. 2011 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02479.x/full.

GLASA, Miroslav, 2010. Biologická a genetická diverzita vírusů šarky slivky. In: POLÁK, J., a kol. 2010. *Šarka peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. s. 22 - 26. ISBN 978-80-7427-039-0.

GLASA, M., CANDRESSE, T., 2008. *Plum Pox Virus*. In: Mahy B.W.J., Van Regenmortel M.H.V., 2010 *Desk encyklopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier – Academic Press, s. 280-284. ISBN: 978-0-12-375148-5.

GRIN-Global. *GRIN Czech 1.9.1* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/AccessionObservation.aspx?id=62532>

HARRISON, N A., RAO, G P., MARCONE, C. *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Texas: Studium Press LLC, U. S. A., 2008. 422 s. ISBN 1-933699-30-2.

HLUCHÝ, M. *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné: ochrana ovocných dřevin a révy vinné v integrované produkci*. Brno: Biocont Laboratory, c1997, 428 s. ISBN 80-901874-2-1.

HUDEC, Kamil a Ján GUTTEN. *Encyklopedie chorob a škůdců: komplexní ochrana vaší zahrady*. Brno: Computer Press, 2007. ISBN 978-80-251-1768-2.

HULL, Roger. *Comparative plant virology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, c2009. ISBN 978-0-12-374154-7.

JANICK, Jules. *Fruit breeding: Volume I. Tree and tropical fruits*. New York: Wiley, 1996. ISBN 04-713-1014-X.

KOMÍNEK, P. *Metody detekce viru šarky švestky*. In: Polák, J. a kol. 2010 *Šarka peckovin – současný stav problematiky v České republice a v Evropě*. Praha: výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., s. 27-35. ISBN: 978-80-7427-039-0.

KADO, Clarence I. *Plant bacteriology*. St. Paul: APS Press, 2010. ISBN 978-0-89054-388-7.

KRŠKA, Boris a Tomáš NEČAS. *Candidatus phytoplasma prunorum* [online]. 2005 [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://zahradaweb.cz/candidatusphytoplasma-prunorum/>

KRŠKA, B., VACHŮN, Z., NEČAS, T., ONDRÁŠEK, I., SALAVA, J., POLÁK, J., 2010. Šlechtění meruněk na resistenci k PPV v ČR a Evropě, nové směry-molekulární markery. In: POLÁK, J., a kol. 2010. *Šarka*

peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. s. 36-46. ISBN 978-80-7427-039-0.

KOCOUREK, František, Martin BAGAR, Vladan FALTA, et al. *Integrovaná ochrana ovocných plodin*. 1. vydání. Praha: Profi Press, s.r.o., 2015. ISBN 978-80-86726-72-4.

KŮDELA, Václav. *Obecná fytopatologie: Fytopatogenní prokaryota (Přednášky)*. 1.vyd. Č.Budějovice: Jihočeská univerzita, 1998. ISBN 80-7040-275-X.

KŮDELA, Václav, Anton NOVACKÝ a Leopold FUCIKOVSKÝ. *Rostlinolékařská bakteriologie*. 1.vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0899-3.

KUTINA, J., G. VANEK, J. KUTINA, P.DVORSKÝ a M. SUCHARDOVÁ. *Pomologický atlas*. 1. vyd. Praha: Brázda, 1991, 287 s. ISBN 80-209-0089-6.

LLÁCER, G., ed. *Acta Horticulturae*. no. 657., proceedings of the XIXth International Symposium Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops : fruit tree diseases, Valencia, Spain, July, 21-25 2003. Leuven: ISHS, 2004. ISBN 90-6605-148-5. ISSN 567-7572.

LAYNE, Desmond R a Daniele BASSI, ed. *The peach: botany, production and uses*. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI, c2008. ISBN 978-1-84593-386-9.

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 rRNA and ribosomal protein gene sequencis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48. s. 1153-1169.

LITSCHMANN, Tomáš, Ivan OUKROPEC a Jaroslav PÁLKA. *Metodika pěstování nektarinek a broskvoní v podmínkách ČR* [CD-ROM]. Lednice: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-240-8.

LUDVÍK, Martin, 2010. Význam pěstování peckovin v České republice. In: POLÁK, J., a kol. 2010. *Šarka peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. s. 5-10. ISBN 978-80-7427-039-0.

NAVRÁTIL, M., VÁLOVÁ, P., STARÝ, M., 2008. Fytoplazmy – obligátní intrabuněčné patogeny. In: NAVRÁTIL, M., FIALOVÁ, R., 2008. *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. V Olomouci: Univerzita Palackého ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností, 2008.s. 6-25. ISBN 978-80-903545-2-4.

NEČAS, Tomáš a Boris KRŠKA. Candidatus phytoplasma prunorum (european stone fruit yellows phytoplasma (ESFY)). In: Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin [online]. s. 1 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/esfy.pdf

NEČAS, T., MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, B., 2008. Studium symptomatologie fytoplazmy evropské žloutenky peckovin. In: NAVRÁTIL, M., FIALOVÁ, R., 2008. *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. V Olomouci: Univerzita Palackého ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností, 2008.s. 125-134. ISBN 978-80-903545-2-4.

NEČAS, T., MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, B., 2008. Spolehlivost detekce cytoplazmy evropské žloutenky peckovin pomocí PCR s využitím vybraných specifických a nespecifických primerů. In: NAVRÁTIL, M., FIALOVÁ, R., 2008. *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. V Olomouci: Univerzita Palackého ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností, 2008.s. 125-134. ISBN 978-80-903545-2-4.

NEČAS, T., MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, B., 2012. Study of Symptoms Variability after Artificial Inoculation by Phytoplasma ESFY in Different *Prunus* Species. In: AVAGYAN, A. a A. KALANTARYAN, ed. *Acta Horticulturae*. no. 966, Proceedings of the International Symposium on XVth Apricot Breeding and

Culture : Yerevan, Armenia, June 20-24, 2011. Leuven: ISHS, Internat. Soc. for Horticultural Science, 2012. s. 123-130. ISBN 978-90-6605-645-9.

NEČAS, T., MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, . 2008. The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. In: ÇAGLAYAN, K a F. ERTUNÇ, ed. *Acta Horticulturae*. no.781. *proceedings of the XXth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops, Antalya, Turkey, May 22 - 26, 2006*. Leueven: ISHS, 2008. s. 443-448. SBN 978-90-6605-080-8.

OLMOS, A., BERTOLINI, E., CAMBRA, M. 2002. *Simultaneous a nd cooperational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses*. *Journal of Virological Methods* 106 (1), s. 51-59.

OSLER, R., S. BORSELLI, P. ERMACORA a kol. Transmissible tolerance to European stone fruit yellows (ESFY) in apricot: cross-protection or a plant mediated process? *Phytoparasitica* [online]. 2016, , 1 - 9 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1007/s12600-016-0509-2. ISSN 18767184. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-84959172002&lang=cs&site=eds-live>

PALEUCHOVÁ, K.: *Studium virových chorob peckovin I*. 1. Vyd.. Nitra: Polnohospodarská univerzita v Nitre, 1980, s. 21-103.

PAPRŠTEIN, František, Jiří SEDLÁK, Aleš MATĚJÍČEK a Jaroslav POLÁK. *Metodika hodnocení netransgenních zdrojů rezistence slivoně vůči viru PPV: certifikovaná metodika*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 2015. Certifikovaná metodika. ISBN 978-80-87030-38-7.

POLÁK, Jaroslav, 2010. Šarka švestky- historie choroby v ČR, Evropě a ve světě, virus šarky švestky, jeho vlastnosti, hostitelský okruh, přenos, šíření, epidemiologie, škodlivost a metody ochrany, mezinárodní projekt SharCo 7. RP EU. In: POLÁK, J., a kol. 2010. *Šarka peckovin - současný stav*

problematiky v České republice a v Evropě. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. s. 11-19. ISBN 978-80-7427-039-0.

POLÁK, J., M. RAVELONANDRO, J. KUMAR-KUNDU, J. PÍVALOVÁ a R. SCORZA. Interactions of Plum pox virus strain Rec with Apple chlorotic leafspot virus and Prune dwarf viruses in field-grown transgenic plum *Prunus domestica* L., clone C5. In: *Plant protection science* [online]. 2008 [cit. 2017-04-10].

Dostupné z:<http://www.agriculturejournals.cz/web/ppls.htm?volume=44&firstPage=1&type=publishedArticle> 31.

RAVELONANDRO, M., BRIARD., GLASA, M. 2008. *The Ability of a Mild Isolate of Plum Pox Virus to protect against Sharka Virus*. ISHS Acta Horticulturae 781, s. 281-286. ISBN:978-90-66050-80-8.

RICHTER, Miloslav. *Velký atlas odrůd ovoce a révy*. Lanškroun: TG TISK, c2002. ISBN 80-238-9461-7.

ROŽNOVSKÝ, J., LITSCHMANN, T. 2011. Klimatické poměry Lednice na Moravě: [online] Mendelova univerzita, Zahradnická fakulta, [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.amet.cz/klima/>

Sharco.eu. *Www.sharco.eu*[online]. 2012[cit. 2016-03-21]. Dostupné z:<http://www.sharco.eu/>

Situační a výhledová zpráva. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 2011.

TEDESCHI, R., V. FERRATO, J. ROSSI a A. ALMA. *Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni**. *Plant Pathology* [online]. 2006, 55(1), 18-24 [cit. 2016-04-12]. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2005.01292.x. ISSN 00320862. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=19411495&lang=cs&site=ehost-live>

THE PLANT LIST. The plant list: A working list of all plant species [online].
The Plant List, © 2017 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z:
<http://www.theplantlist.org/>

WEINTRAUB, P. G a P. JONES. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts, and vectors*. Cambridge, MA: CABI North American Office, 2010, xii, 331 s. ISBN 978-1-84593-530-6.

Seznam obrázků

Obrázek 1- Svinutka listů na listech saldcotu způsobená ESFY v technickém izolátu na MENDELEU. Zdroj: autor	40
Obrázek 2-Difúzní skvrny na listové ploše Myrobalánu způsobené PPV. V technickém izolátu na MENDELEU. Zdroj: autor.....	41
Obrázek 3- Technický izolát na MENDELEU 4.5.2016. Zdroj: autor	63
Obrázek 4-Technický izolát na MENDELEU 7.9.2016. Zdroj: autor	63
Obrázek 5-Technický izolát na MENDELEU 7.9.2016. Zdroj: autor	64
Obrázek 6- Difuzní skvrny způsobené PPV na rostlině v technickém izolátu. Zdroj: autor.....	64
Obrázek 7- Skvrny způsobené PPV na Diamond princess v technickém izolátu na MENDELEU. Zdroj: autor.....	65
Obrázek 8-Skvrny na Saldcotu způsobené PPV v technickém izolátu. Zdroj: autor.	65
Obrázek 9- Inokulace v technickém izolátu v létě 2016. Zdroj: autor.....	66
Obrázek 10- Svinutka listů způsobená ESFY v technickém izolátu. Zdroj: autor	66
Obrázek 11-Předčasně kvetoucí Vestar v technickém izolátu na MENDELEU 10.4.2017. Zdroj: autor.....	67
Obrázek 12-Technický izolát na MENDELEU 10.4.2017 Zdroj: autor	67

Seznam tabulek

Tabulka 1-Průměrný rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnožích St. Julien, M-LE-1, Myrobalán na odrůdách Saldcot a Vestar (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	39
Tabulka 2-Průměrný rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnožích St. Julien, M-LE-1, Myrobalán a odrůdách Suncrest, Diamond Princess a Miss Italia (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	42
Tabulka 3-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži St. Julien s inokulem Saldcot (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	68
Tabulka 4-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži M-LE-1 s inokulem Saldcot (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	69
Tabulka 5-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži Myrobalán s inokulem Saldcot (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	70
Tabulka 6-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži M-LE-1 s inokulem Vestar (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	71
Tabulka 7-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži Myrobalán s inokulem Vestar (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	72

Tabulka 8-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů ESFY v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži St. Julien s inokulem Vestar (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).....	73
Tabulka 9-Tabulka 8-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži St. Julien s inokulem Suncrest (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).....	74
Tabulka 10-Tabulka 8-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži Myrobalán s inokulem Diamond Princess (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).	75
Tabulka 11-Tabulka 8-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži M-LE-1 s inokulem Miss Italia (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).....	76

Seznam grafů

Graf č. 1-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v tecnickém izolátu na Myrobalánu s inokulum Diamond Princess během sledovaného období.....	43
Graf č. 2-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v tecnickém izolátu na M-LE-1 s inokulem Miss Italia během sledovaného období.	44
Graf č. 3-Četnost výskytu průměrných symptomů PPV v tecnickém izolátu na St. Julien s inokulem Suncrest během sledovaného období.	45

Přílohy



Obrázek 3- Technický izolát na MENDELEU 4.5.2016. Zdroj: autor



Obrázek 4-Technický izolát na MENDELEU 7.9.2016. Zdroj: autor



Obrázek 5-Technický izolát na MENDELEU 7.9.2016. Zdroj: autor



Obrázek 6- Difuzní skvrny způsobené PPV na rostlině v technickém izolátu. Zdroj: autor



Obrázek 7- Skvrny způsobené PPV na Diamond princess v technickém izolátu na MENDELEU. Zdroj: autor



Obrázek 8-Skvrny na Saldcotu způsobené PPV v technickém izolátu. Zdroj: autor.



Obrázek 9- Inokulace v technickém izolátu v létě 2016. Zdroj: autor.



Obrázek 10- Svinutka listů způsobená ESFY v technickém izolátu. Zdroj: autor



Obrázek 11-Předčasně kvetoucí Vestar v technickém izolátu na MENDELEU 10.4.2017. Zdroj: autor



Obrázek 12-Technický izolát na MENDELEU 10.4.2017 Zdroj: autor

Tabulka 9-Tabulka 8-Rozsah vizuálně hodnocených symptomů PPV v průběhu sledovaného vegetačního období na podnoži St. Julien s inokulem Suncrest (hodnocených na pokusu na pozemku ZF Mendelovy Univerzity v Lednici roku 2016).

St. Julien/ Suncrest-Pozorování symptomů PPV											
Datum pozorování:	4.5.16-1.	18.5.16-2.	2.6.16-3.	17.6.16-4.	4.7.16-5.	20.7.16-6.	5.8.16-7.	22.8.16-8.	7.9.16-9.	Termín opadu	
Číslo stromu	Symptomy										
Inokul	1	0	0	0	1	1	0	0	0	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	2	0	1	2	2	0	0	0	0	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	3	0	0	1	1	0	0	0	0	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	3	3	3	27.10.16	
Inokul	4	Neuchyceno									27.10.16
Podnož		0	0	3	3	3	3	3	3	27.10.16	
Inokul	5	0	1	2	2	0	2	2	2	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	6	0	0	0	0	3	3	3	3	27.10.16	
Podnož		0	0	3	3	2	3	2	2	27.10.16	
Inokul	7	0	1	1	1	2	3	3	2	27.10.16	
Podnož		0	2	3	3	3	3	3	3	27.10.16	
Inokul	8	0	0	2	2	1	1	2	2	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	9	0	0	2	2	0	3	3	3	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	10	Neuchyceno									27.10.16
Podnož		0	0	3	3	2	3	3	3	27.10.16	
Inokul	11	0	0	2	2	2	3	3	3	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	12	0	0	0	1	2	3	3	3	27.10.16	
Podnož		0	0	0	0	0	0	0	0	27.10.16	
Inokul	13	0	0	2	2	3	3	3	2	27.10.16	
Podnož		0	3	3	3	3	2	2	2	27.10.16	

