

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Lucie Bílková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně-genetická charakteristika
fytoplazmy proliferace jabloně
(*Ca. Phytoplasma mali*) v kontextu
latentních infekcí jabloní**

Bakalářská práce

Lucie Bílková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Lucie Bílková

Souhrn

Fytoplazmy jsou jednoduché prokaryotní organismy bez buněčné stěny, které se vyskytují ve floému rostlin a hemolymfě hmyzích vektorů. Fytoplazma proliferace jabloně je jedním z nejdůležitějších fytoplazmových onemocnění v Evropě. Typickými příznaky napadení jabloní fytoplazmou proliferace jabloně je zvětšení palistů a proliferace oček a výhonů (metlovitost). Infekce fytoplazmou proliferace jabloně také vede ke značnému snížení výnosu a kvality ovoce. Příznaky nemusí být viditelné, jejich intenzita závisí na stáří rostliny a daném kultivaru. Bezpříznakové infekce jsou důležité pro ekologii a epidemiologii fytoplazmových onemocnění, jelikož latentně infikované rostliny mohou sloužit jako zdroj infekce.

Bakalářské práce byla zaměřena na porovnání výskytu fytoplazmy proliferace jabloně ve dvou sadech, které byly udržovány v odlišných systémech pěstování, s důrazem na detekci latentních infekcí a porovnání genetické variability detekovaných izolátů. Jeden sad byl v tzv. integrovaném systému pěstování a druhý v přechodovém systému pěstování. Výskyt jabloní infikovaných fytoplazmou proliferace jabloně byl nižší v sadu v intenzivním způsobu pěstování, kde bylo detekováno 5,8 % případů oproti sadu v ekologickém způsobu pěstování, kde bylo detekováno 18 % případů. Genetickou analýzou detekovaných izolátů 'Ca. Phytoplasma mali' bylo zjištěno, že převládaly genotypy příslušející profilu A+1 genu pro 16S-23S rRNA a profilu A genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3. Vyšší variabilita byla detekována v případě genu pro nitroreductase-like protein, kdy byly zaznamenány genotypy AT-1, AT-2 a AP15. Fylogenetickou analýzou genu pro HflB proteasu byla zjištěna vysoká variabilita studovaných izolátů fytoplazmy proliferace jabloně v této části genomu. Byly nalezeny konkrétní motivy *HflB* genu, které jsou spojovány s příznakovostí izolátů fytoplazmy proliferace jabloně. Tyto motivy ale nebyly v souladu s pozorovanými symptomy.

Summary

Phytoplasmas are single-celled procaryotic organisms without cell wall which can survive and multiply only in plant phloem or in the haemolymph of insect vectors. Apple proliferation phytoplasma is one of the most important phytoplasma diseases in Europe. Typical symptoms of apple proliferation phytoplasma can be observed in the form of elongated stipules and witches' broom. Infection also leads to a significant decrease in overall yield and fruit quality. Symptoms may not be visible; its intensity depends on the age of the plant and the cultivar. Asymptomatic infections are important for ecology and epidemiology of phytoplasma diseases as latently infected plants may serve as a source of infection.

The experimental part of this bachelor thesis was aimed to study the occurrence and variability of apple proliferation phytoplasma with emphasis on detection of latent infection. A comparative study to evaluate the specific risk of apple proliferation spreading has been carried out in conventional and organic apple orchards. Diseased tree incidence was generally lower in conventional orchard. In general, detected high frequency of latent infections represents the risk of apple proliferation disease spreading in both types of orchards (conventional – 5.8 %, organic – 18 %). Genotyping of isolates of '*Ca. Phytoplasma mali*' coming from infected apple trees showed prevalence of A+1 profile of 16-23S rDNA and A profile of *rpl22-rps3* gene. Higher variability was detected in nitroreductase-like protein gene; all the AT1, AT2 and AP15 genotypes were noticed. Phylogenetic analysis of *HflB* gene determined high variability of the studied isolates of apple proliferation phytoplasma in this part of the genome. There are specific motives of *HflB* gene which are associated with markedness of isolates of apple proliferation phytoplasma. But these motives did not correspond to the observed symptoms.

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za její odborné rady, čas, který mi věnovala, ale také za ochotu, trpělivost a vstřícný přístup při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat p. Janě Veselské za pomoc při praktické části mé práce. Bakalářská práce byla financována Interní grantovou agenturou Univerzity Palackého v Olomouci, v rámci projektu IGA_PrF_2015_003, a v rámci projektu NAZV (MZe) QJ1210209.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	10
3	Literární přehled.....	11
3.1	Obecná charakteristika fytoplazem.....	11
3.2	Klasifikace fytoplazem	11
3.3	Genom fytoplazem.....	12
3.4	Metody detekce a identifikace fytoplazem	12
3.4.1	Detekce fytoplazem	12
3.4.2	Identifikace fytoplazem	13
3.5	Fytoplazma proliferace jabloně (<i>'Candidatus Phytoplasma mali'</i>).....	14
3.5.1	Příznaky infekce fytoplazmou proliferace jabloně.....	14
3.5.2	Hostitelský okruh fytoplazmy proliferace jabloně	16
3.5.3	Přenos a šíření fytoplazmy proliferace jabloně	17
3.5.4	Geografické rozšíření fytoplazmy proliferace jabloně	18
3.5.5	Hospodářský význam fytoplazmy proliferace jabloně.....	19
3.6	Genetická variabilita fytoplazmy proliferace jabloně.....	19
3.6.1	Gen pro 16S rRNA	19
3.6.2	Gen pro ribosomální proteiny rpl22-rps3	20
3.6.3	Gen pro nitroreductase-like protein.....	20
3.6.4	Gen pro HflB proteasu.....	21
3.7	Fytoplazma proliferace jabloně v České republice.....	21
3.8	Latentní infekce	22
4	Materiál a metody.....	24
4.1	Rostlinný materiál.....	24
4.2	Izolace DNA	24
4.3	PCR reakce	25

4.3.1	Detekce fytoplazmy	25
4.3.2	Studium genetické variability	25
4.4	Vyhodnocení výsledků PCR reakce pomocí elektroforetické separace	29
4.5	Identifikace fytoplazem pomocí RFLP	29
4.6	Genotypizace	30
4.7	Izolace PCR produktu z gelu	31
4.8	Sekvenační značení	31
4.9	Analýza sekvencí DNA	33
5	Výsledky.....	34
6	Diskuze.....	44
7	Závěr.....	46
8	Seznam použitých zkratk.....	48
9	Seznam použité literatury	49

1 Úvod

Fytoplazmy jsou jednoduché prokaryotní organismy, které patří k nejmenším mikrobům třídy *Mollicutes*. Tyto rostlinné fytopatogeny obsahují jednu vrstvu plazmatické membrány a postrádají buněčnou stěnu. Vyskytují se především ve floémové šťávě rostlin a v těle hmyzích vektorů (křísi, mery, ploštice). Fytoplazmy vyvolávají různě závažné příznaky chorob u přibližně tisíce rostlinných druhů a způsobují tak značné ekonomické ztráty. Na začátku devadesátých let dvacátého století umožnily PCR techniky spolu s RFLP analýzou přesnou identifikaci různých druhů a kmenů fytoplazem a jejich detailní studium.

'*Candidatus Phytoplasma mali*' je původce fytoplazmy proliferace jabloně (AP), která je jedním z nejvýznamnějších fytoplazmových onemocnění v Evropě. Patří do 16SrX-A skupiny fytoplazmy proliferace jabloně. Hlavním hostitelem této fytoplazmy jsou jabloně (Rosaceae: *Malus* spp). Typickými příznaky napadení jabloní fytoplazmou proliferace jabloně je proliferace oček a výhonů (metlovitost) a zvětšení palistů. AP značně snižuje výnos a kvalitu ovoce. '*Candidatus Phytoplasma mali*' je uvedena na seznamu karanténních škodlivých organismů EPPO A2 od roku 1992 a je v České republice řazena mezi karanténní škodlivé organismy podle zákona č. 147/1996 Sb. v platném znění.

2 Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce je:

1. Vypracování literární rešerše na téma fytoplazma proliferace jabloně, její molekulárně genetická variabilita a hostitelský okruh, s přihlédnutím k významu latentních infekcí.
2. Zvládnutí technik izolace DNA, PCR, 'nested' PCR, RFLP, sekvenování, bioinformatické hodnocení dat.
3. Analýza vybraného souboru jabloní (r. *Malus*), vyhodnocení výskytu proliferace jabloně a srovnání komerční a organické výsadby.
4. Molekulárně genetická charakteristika detekovaných izolátů 'Ca. Phytoplasma mali' a jejich porovnání se známými izoláty fytoplazmy.

3 Literární přehled

3.1 Obecná charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou jednoduché prokaryotní organismy bez buněčné stěny, které se vyskytují ve floému rostlin a hemolymfě hmyzích vektorů (IRPCM, 2004; Lee a kol., 1992, 1995). Představují je kulovité, oválné až protáhlé buňky obalené pouze jednotkovou plazmatickou membránou (Doi a kol., 1967). S jejich velikostí přibližně 500 nm v průměru a velikostí genomu v rozmezí od 530 do 1350 kilobází (Marccone a kol., 1999b; Neimark a Kirkpatrick, 1993) patří k nejmenším mikrobům třídy *Mollicutes* (Marccone a kol., 1999b). Vyznačují se jedinečnou oligonukleotidovou sekvencí genu pro 16S rRNA, a to CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT (IRPCM, 2004). Fytoplazmy vyvolávají různě závažné příznaky chorob u přibližně tisíce rostlinných druhů (Seemüller a kol., 2002) a způsobují tak značné ekonomické ztráty (Strauss, 2009). Většina fytoplazem jsou karanténní organismy uvedené na seznamu druhů doporučených k regulaci a karanténě EPPO A1/A2 (EPPO, 2015).

3.2 Klasifikace fytoplazem

V roce 1992 byl navržen nový triviální název pro MLOs zohledňující jejich vztah k rostlinám – fytoplazmy (International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1993). Klasifikace fytoplazem v současné době je založena na dvou samostatných systémech vycházejících z genetické variability genu pro 16S rRNA. První systém, historicky starší, vychází z variability fragmentu ohraničeného primery R16F2/R16R2, zjištěné na základě analýzy restrikčními endonukleázami. V tomto systému jsou fytoplazmy klasifikovány do 16Sr skupin; v současnosti je popsáno třicet dva 16Sr skupin a více než 100 podskupin (Saeed a kol., 2016). Druhým systémem, který byl navržen na začátku 20. století, byla vytvořena kategorie provizorního druhu '*Candidatus Phytoplasma*'. Klasifikace fytoplazem je založena na základě analýzy variability genu pro 16S rRNA, kdy příslušník druhu musí vykazovat menší než 97,5% podobnost s jakýmkoli již dříve popsaným druhem '*Candidatus Phytoplasma*'. Nový druh může být popsán také v případě vyšší shody, jedná-li se o prokazatelně ekologicky oddělenou populaci. Potom musí splňovat následující podmínky: fytoplazmy mají, v porovnání s již známými druhy fytoplazem, odlišného hmyzího vektora, liší se okruhem hostitelů a existují doložené molekulární rozdíly stanovené na základě DNA hybridizace, sérologické reakce nebo pomocí

PCR (IRPCM, 2004). Do současnosti bylo oficiálně přijato či navrženo 43 druhů '*Candidatus Phytoplasma*' (Šafářová a kol., 2016a).

3.3 Genom fytoplazem

Velikost chromozomu fytoplazem se pohybuje od 530 do 1350 kilobází (Marcone a kol., 1999b; Neimark a Kirkpatrick 1993). Genom fytoplazem nese geny pro realizaci hlavních molekulárních funkcí, jako jsou replikace, transkripce a translace (Jung a kol., 2003; Kakizawa a kol., 2001). Pro fytoplazmy je charakteristické, že na rozdíl od živočišných mykoplazmat nesou spacer region (o délce přibližně 300 bp), mezerník mezi 16S a 23S rDNA oblastí (Smart a kol., 1996). U fytoplazem byly objeveny repetitivní a mobilní elementy; ukazuje se, že až 23 % repetitivních oblastí DNA je organizováno v potencionálních mobilních jednotkách (PMU), které se podílejí na rozdílech ve standardních metabolických a nemetabolických drahách mezi fytoplazmami (Bai a kol., 2006). Genom fytoplazem má nízký obsah C+G bází (21–28 %), stejně jako mykoplazmy (Glass a kol., 2000) a endosymbiotické bakterie (Tamas a kol., 2002; Wernegreen, 2002). UGA má u fytoplazem funkci stop kodonu, nikoli funkci jako kodon tryptofanu (Lim a Sears 1991; Toth a kol., 1994).

Prvním popsaným genomem fytoplazem byl genom fytoplazmy žloutenky aster (izolát: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Oshima a kol., 2004). Druhým popsaným genomem byl genom dalšího izolátu fytoplazmy žloutenky aster (izolát: Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB) (Bai a kol., 2006). V roce 2007 byla stanovena třetí kompletní sekvence genomu '*Candidatus Phytoplasma mali*' (kmen AT) (Kube a kol., 2007). Posledním do současnosti popsaným genomem byl genom '*Ca. P. australiense*' (Tran-Nguyen a kol., 2008). Pro '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Ca. Phytoplasma pyri*' a '*Ca. Phytoplasma prunorum*' je charakteristický chromozom lineární, zatímco genom většiny ostatních fytoplazem podobně jako bakterií je tvořen cirkulárním chromozomem (Kube a kol., 2008).

3.4 Metody detekce a identifikace fytoplazem

3.4.1 Detekce fytoplazem

Detekce fytoplazem je založena na základě metody PCR. PCR je velmi citlivá, ale vzhledem k nízkému titru fytoplazem je pro přesnou diagnózu nezbytné její citlivost ještě

zvýšit, což je možné provedením 'nested' PCR (Gundersen a kol., 1994), kdy amplifikační produkt první reakce slouží jako templát pro následnou amplifikaci. Prvním stupněm je 'direkt' PCR, při níž se většinou užívají primery P1/P7 (Deng a Hiruki, 1991; Schneider a kol., 1995), které amplifikují 16S-23S rDNA o délce cca 1800 bp. Pro zvýšení citlivosti a odstranění inhibičních látek se produkt naředí (1:29 až 1:50 sterilní destilovanou vodou) a amplifikuje v 'nested' PCR, obvykle s pomocí primerů R16F2/R16R2 (Lee a kol., 1993), případně fU5/rU3 (Lorenz a kol., 1995). Nezbytným předpokladem úspěšné PCR amplifikace fytoplazmové DNA je izolace celkové DNA z rostliny či vektoru v dostatečné kvalitě (Firrao a kol., 2007). Pro určení diverzity a přesnější identifikaci fytoplazem se dále využívají i jiné oblasti genomu fytoplazem mimo oblast 16S-23S rDNA. Univerzální i skupinově specifické primery pro detekci fytoplazem byly odvozeny nejen od sekvence genu pro 16S rRNA, ale i od sekvencí genu pro ribosomální proteiny, *SecY* a *Tuf* genů a *imp* genu (Lee a kol., 1994, 2004a,b, 2006b, 2010; Martini a kol., 2002, 2007a; Schneider a kol., 1997; Mitrovic' a kol., 2011; Smart a kol., 1996).

3.4.2 Identifikace fytoplazem

Pro identifikaci se používá široké spektrum restričních endonukleáz. Porovnáním restričních spekter s kontrolními vzorky nebo literárními údaji je možné přesně identifikovat danou fytoplazmu (Lee a kol., 1998). Pro rozlišení jednotlivých skupin a podskupin fytoplazem se používá základní soubor sedmnácti restričních endonukleáz: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*, *ThaI*, *MseI* a *Sau3AI* (Lee a kol., 1993, 1998). Na začátku devadesátých let dvacátého století umožnily PCR techniky spolu s RFLP analýzou přesnou identifikaci různých kmenů a druhů fytoplazem (Namba a kol., 1993; Lee a kol., 1993; Schneider a kol., 1993). Pro lepší rozlišení jednotlivých druhů fytoplazem se k analýzám využívá větší počet restričních endonukleáz (Lee a kol., 1993).

Fytoplazma proliferace jabloně patří do skupiny 16SrX společně s dalšími fytoplazmami. Pro její identifikaci se používá analýza restričních profilů *AluI* a *RsaI* (Schneider a kol., 1993). Fytoplazmu '*Ca. Phytoplasma mali*' lze odlišit od '*Ca. Phytoplasma pyri*' RFLP analýzou pomocí restričních endonukleáz *SspI* a *BsaAI*, a od '*Ca. Phytoplasma prunorum*' pomocí restričních endonukleáz *RsaI*, *BsaAI*, *SspI* a *SfcI* (Seemüller a Schneider, 2004).

3.5 Fytoplazma proliferace jabloně (*'Candidatus Phytoplasma mali'*)

'Candidatus Phytoplasma mali' (*'Ca. Phytoplasma mali'*) je původce fytoplazmy proliferace jabloně (AP), která je jedním z nejvýznamnějších fytoplazmových onemocnění v Evropě (Seemüller a kol., 2011). Patří do 16SrX-A skupiny fytoplazmy proliferace jabloně (Lee a kol., 1998). *'Ca. Phytoplasma mali'* je uvedena na seznamu karanténních škodlivých organismů EPPO A2 od roku 1992 (EPPO, 2015) a je v České republice řazena mezi karanténní škodlivé organismy podle zákona č. 147/1996 Sb. v platném znění. Fytoplazma proliferace jabloně byla popsána jako *'Candidatus Phytoplasma mali'* na základě specifity vektoru a hostitelského okruhu v roce 2004 (Seemüller a Schneider, 2004).

3.5.1 Příznaky infekce fytoplazmou proliferace jabloně

Fytoplazma proliferace jabloně vyvolává specifické i nespecifické příznaky na výhoncích, listech, plodech a kořenech. Prvním příznakem onemocnění je často červenání listů objevující se od konce léta do poloviny podzimu. V červenci nebo srpnu následujícího roku může docházet u symptomatických stromů ke vzniku metlovitosti (*'witches' brooms'*) (Casati a kol., 2010; Lee a kol., 2000; Seemüller a kol., 2002). Jedná se o nejvýraznější symptom, který vzniká potlačením apikální dominance a růstem běžně dormantních axilárních pupenů na horní části vitálních výhonků. Výsledné sekundární výhonky jsou strmě vzpřímené a liší se od normálně rostoucích bočních pupenů svírajících tupý úhel (Bovey, 1963). Typickým příznakem AP jsou také zvětšené palisty, které mají charakter malého listu, jsou rozděleny na řapík a čepel, čepel je pravidelně zoubkovaná (Casati a kol., 2010; Seemüller a Schneider, 2007; Baric a kol., 2007). Metlovitost a zvětšené palisty jsou jedinými příznaky AP, které umožňují spolehlivou diagnózu (Seemüller, 1990). Podobné příznaky však byly zaznamenány v Litvě a byly spojeny s infekcí fytoplazmou žloutenky aster (*'Ca. Phytoplasma asteris'*) (Jomantiene a Davis, 2005).

Nápadným příznakem fytoplazmy proliferace jabloně je pozdní a opakované kvetení. Infekce fytoplazmou proliferace jabloně způsobuje redukci velikosti (asi o 50 %) a hmotnosti (o 63 až 74 %) plodů, snižuje jakost ovoce, plody mají delší stopky ve srovnání s plody zdravých stromů (Kunze, 1976). Listy jsou často menší, světle zelené až chlorotické. Průvodním znakem napadení fytoplazmou je zvýšená citlivost k padlí jabloně (*Podospaera leucotricha*) (Maszkiewicz a kol., 1980). AP rovněž zvyšuje citlivost k napadení houbou pevníkem nachovým (*Chondrostereum purpureum*) (Németh, 1986). Vitalita mladých stromů je výrazně snížena a jejich kořenový systém je slabě vyvinut, kořeny bývají krátké, zmnožené

a nitkovitě. Stromy infikované v pozdější fázi růstu s dobře vyvinutým kořenovým systémem lépe snášejí onemocnění a pozorujeme u nich ozdravení (Kunze, 1989; Seemüller, 1990).

Symptomy se vyskytují v korunách stromů nerovnoměrně a kolísají v závislosti na odrůdě, věku, vitalitě stromu a klimatických podmínkách (Seemüller a kol., 1998). Pro nově napadené stromy jsou typické příznaky metlovitost a podměrečné plody; tyto příznaky lze pozorovat po omezenou dobu, pouze jeden rok nebo několik let poté, co se poprvé objeví. Stromy se mohou začít ozdravovat a objevuje se u nich pouze červení listů a zvětšené palisty a nakonec se mohou stát nepříznakovými po jeden či více roků. U ozdravených stromů vymizí fytoplasma z koruny, ale stále zůstává aktivní v kořenech a může být přenášena na zdravé stromy (Carraro a kol., 2004; Musetti, 2004). Během této 'recovery' fáze se zvyšuje výnos, velikost a kvalita plodů. Výnos částečně zotavených stromů dosahuje přibližně šedesáti procent výnosu zdravých stromů (Kunze, 1989). Později se mohou znovu objevit silné příznaky infekce (Carraro a kol., 2004; Seemüller a kol., 1984, 2010).

Změna v expresi symptomů se může vztahovat k sezónnímu kolísání populace fytoplazem v nadzemních částech infikovaných stromů. Fytoplazmy jsou závislé na funkčních sítkovicích, a jelikož sítkovice přestanou fungovat na konci podzimu až začátkem zimy, patogen je během zimy z nadzemních částí eliminován. Přežije však v kořenech, kde jsou funkční sítkovice v průběhu celého roku. Na jaře, kdy se tvoří nový floém, může znovu kolonizovat nadzemní části rostliny. Rekolonizace probíhá častěji v prvních letech choroby, později však nemusí k rekolonizaci dojít každý rok či vůbec. Stromy intenzivně kolonizované v nadzemních částech obvykle vykazují charakteristické příznaky, zatímco ty jen částečně, slabě nebo nekolonizované mají mírné příznaky či žádné. Kořenový systém infikovaných stromů zůstává kolonizovaný po celý život rostliny (Carraro a kol., 2004; Pedrazzoli a kol., 2008a; Schaper a Seemüller, 1982, 1984, Seemüller a kol., 1984a, 1984b).

Symptomatologie popsaná výše je typická pro kultivary pěstované na podnožích *Malus × domestica*. U tohoto genetického materiálu však existují určité rozdíly v odpovědi na infekci v závislosti na konkrétní použité podnoži. Výskyt a závažnost onemocnění je vyšší u stromů na vitální podnoži, jako je M 4, M 11 a MM 104, nežli na převažující standardní podnoži M 9 (Kunze, 1989). Také samotné kultivary se v reakci do jisté míry liší. Více byla postižena vitalita a výnos kultivarů 'Starking', 'McIntosh' a 'Jonathan' než kultivarů 'Idared' a 'Spartan' (Zawadzka, 1976). Kultivary odolné vůči strupovitosti 'Florina', 'Prima' a 'Priscilla' se ukázaly jako velmi vnímavé na fytoplazmu proliferace jabloně (Loi a kol., 1995).

Byla zaznamenána značná variabilita ve virulenci 'Ca. Phytoplasma mali'. Na základě příznakovosti mohou být kmeny fytoplazem označovány jako avirulentní, mírně, středně nebo silně virulentní. Stromy mohou být současně napadeny více než jedním kmenem fytoplazmy proliferace jabloně (Seemüller a Schneider, 2007; Seemüller a kol., 2010). V některých případech může dojít k předčasné smrti infikovaných stromů (Németh, 1986; Seemüller, 1990; Smith a kol., 1988).

3.5.2 Hostitelský okruh fytoplazmy proliferace jabloně

Hostitelský okruh AP zahrnuje většinu odrůd jabloní (Rosaceae: *Malus* spp). Za hostitele jsou dále považovány druhy v rámci čeledi Rosaceae (*Pyrus communis* L. [hrušeň obecná]), Apocynaceae (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don [barvínek růžový]), Betulaceae (*Corylus avellana* L. [líška obecná]), Vitaceae (*Vitis vinifera* L. [réva vinná]), Convolvulaceae (*Convolvulus arvensis* L. [svlačec rolní]), a Poaceae (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. [troskut prstnaný]) (CABI, 2011; Del Serrone a kol., 1998; Marcone a kol., 1996b; Matus a kol., 2008; Schneider a kol., 1997). Seznam hostitelů a jejich zeměpisný původ je uveden v Tab. 1.

Většina odrůd jabloní je vnímavá (CABI, 2011), za vnímavé jsou považovány odrůdy 'Belle de Booskop', 'Gravestein', 'Golden Delicious' a 'Winter Banana'. K velmi vnímavým odrůdám patří 'Florina', 'Prima' a 'Priscilla' (Loi a kol., 1995a). Středně vnímavé jsou odrůdy 'Idared', 'McIntosh', 'Starking' a 'Starkrimson' (Németh, 1986). Tolerantních odrůdy zahrnují 'Roja de Benejama', 'Antonokova', 'Cortland', 'Spartan', 'Yellow transparent' a 'Wealthy' (Németh, 1986). Odrůdy 'Prima', 'Florina' a 'Priscilla', o kterých je známo, že jsou odolné vůči strupovitosti (*Venturia inaequalis*), byly odvozeny z kultivarů vnímavých k fytoplazmě proliferace jabloně, jako jsou 'Golden Delicious', 'Starking Delicious', 'McIntosh', 'Jonathan', 'Rome Beauty' a 'Malus floribunda 821' (Kartte a Seemüller, 1988).

Fytoplazma byla experimentálně přenesena rouby na *Malus baccata*, *M. coronaria*, *M. domestica*, *M. floribunda*, *M. fusca*, *M. gloriosa*, *M. ionensis*, *M. × platycarpa*, *M. purpurea*, *M. × robusta* (Németh, 1986). Přirozená rezistence k 'Candidatus Phytoplasma mali' byla objevena u *Malus sieboldii*, tento druh je diskutován jako možný zdroj rezistence při šlechtění nových odrůd jabloní (Kartte a Seemüller, 1988, 1991; Jarausch a kol., 2008; Seemüller a kol., 2007).

Tab. 1: Seznam hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně

Latinské jméno	České jméno	Zeměpisný původ	Reference
<i>Malus domestica</i> Borkh.	jabloň domácí	Evropa	Lorenz a kol., 1995; Rui a kol., 1950
<i>Malus prunifolia</i> Desf. ex Steud.	jabloň třešňolistá	žádné údaje	CABI 2011
<i>Malus pumila</i> Mill.	jabloň obecná	žádné údaje	CABI 2011
<i>Pyrus communis</i> L.	hrušeň obecná	Maďarsko	Del Serrone a kol., 1998
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	svlačec rolní	Německo	Schneider a kol., 1997
<i>Corylus avellana</i> L.	líška obecná	Itálie	Marcone a kol., 1996b
<i>Prunus domestica</i> L.	švestka domácí	Tunisko	Ben Khalifa a Fakhfakh, 2011a
<i>Prunus domestica</i> L.	švestka domácí	Slovensko	Mehle a kol., 2007
<i>Prunus salicina</i> Lindl.	slivoň vrbová	žádné údaje	CABI 2011
<i>Prunus persica</i> var. <i>Nucipersica</i> (Suckow) C. K. Schneid.	broskvoň obecná nektarinka	Polsko	Cieslinska a Morgas, 2011
<i>Ribes rubrum</i> L.	rybíz červený	Česká republika	Navrátil a kol., 2007
<i>Vitis vinifera</i> L.	réva vinná	Chile	Matus a kol., 2008
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	hloh jednosemenný	Itálie	Tedeschi a kol., 2009
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	troskut prstnaný	žádné údaje	CABI 2011
<i>Dahlia</i> × <i>cultorum</i>	jiřina	Polsko	Kamińska a Śliwa, 2008b
<i>Lilium</i> spp. L.	lilie spp. (cv. Siberia)	Polsko	Kamińska a Śliwa, 2008a
<i>Nicotiana occidentalis</i>	tabák	žádné údaje	Berg a kol., 1999
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	tabák virginský	žádné údaje	Berg a kol., 1999
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	třešeň ptačí	Slovensko	Mehle a kol., 2007
<i>Prunus armeniaca</i> L.	meruňka obecná	Slovensko	Mehle a kol., 2007

3.5.3 Přenos a šíření fytoplazmy proliferace jabloně

V agrosystémech se fytoplazmy rozšiřují vegetativním množením rostlinného materiálu, pomocí roubů a oček z infikovaných rostlin (Lee a kol., 2000). Mohou se experimentálně přenášet prostřednictvím parazitických rostlin, zejména kokotice (*Cuscuta* spp.) (Heintz, 1986; Marwitz a kol., 1974). Byl zaznamenán přenos AP kořenovými srůsty ve středně starých a starých jabloňových sadech (Baric a kol., 2008; Bliedernicht a Krczal,

1995; Ciccotti a kol., 2008; Vindimian a kol., 2002). Přenos fytoplazem semeny nebo pylem se zatím nepodařilo potvrdit (Card a kol., 2007; Cordova a kol., 2003; Khan a kol., 2002). Fytoplazmy nejsou přenosné mechanickou inokulací (Lee a kol., 2000).

Přenos AP se uskutečňuje také pomocí bodavě savého hmyzu patřícího do rodu *Cacopsylla* (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psylloidea) (Marzachi a kol., 2004). Bylo prokázáno, že hlavními vektory 'Candidatus Phytoplasma mali' jsou *Cacopsylla picta* (Förster) a *Cacopsylla melanoneura* (Förster) (Frisinghelli a kol., 2000; Jarausch a kol., 2003, 2004a; Mattedi a kol., 2008; Pedrazzoli a kol., 2007; Tedeschi a Alma, 2004). Za dalšího vektora je považován *Fieberiella florii* (Stål) (Krczal a kol., 1989; Tedeschi a Alma, 2006). Přenos fytoplazmy proliferace jabloně probíhá perzistentním způsobem. Hmyz je schopen přenosu na další rostlinu teprve po úspěšném sání na infikované rostlině a po proběhnutí tzv. latentní periody, někdy nazývané inkubační dobou (Carraro a kol., 2001). Doba akvizičního sání je velmi variabilní – je udávána v rozmezí od několika minut přes několik hodin až dní. Latentní perioda je závislá na teplotě a obecně může trvat v rozmezí pár dní až do 80 dní, nejčastěji jde o 2 až 4 týdny (Murrall a kol., 1996).

3.5.4 Geografické rozšíření fytoplazmy proliferace jabloně

Mezi prvními zeměmi se zaznamenanými příznaky fytoplazmy proliferace jabloně byla například Itálie, oblast Veneto (Rui a kol., 1950). Na začátku 60. let se fytoplazma proliferace jabloně vyskytovala velmi často, následně došlo k poklesu výskytu AP z důvodu používání zdravého rostlinného materiálu pro vegetativní množení. Od roku 1995 byly zaznamenány významné lokální epidemie v několika evropských zemích způsobené fytoplazmou proliferace jabloně, například v Itálii, Německu a na Slovensku (Bertaccini a kol., 2008; Blystad a kol., 2012; Brzin a kol., 2003; Jarausch a kol. 2004a; Loi a kol., 1995) včetně České republiky (Blažek a kol., 2005; Fialová a kol., 2003; Fránová a kol., 2008; Kučerová a kol., 2005; Navrátil a kol., 1998).

Fytoplazma proliferace jabloně byla do současnosti detekována v Africe (Tunisko), Asii (Sýrie, Turecko) a je rozšířena po celé Evropě. Je známá z Albánie, Belgie, Bosny a Hecegoviny, Bulharska, České republiky, Finska, Francie, Chrovatska, Itálie, Maďarska, Moldavska, Německa, Polska, Rakouska, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Srbska, Španělska, Švýcarska a Ukrajiny (Al-Jabor a Gharz Edin, 2009; Avinent a Llacer, 1995; Ben Khalifa a Fakhfakh, 2011a; CABI, 2009; Canik a Ertung, 2007; Del Serrone a kol., 1998; Delic a kol., 2007; Dudek a kol., 2008; EPPO, 1997, 2011; Fialová a kol., 2003; Križanac

a kol., 2010; Lemmetty a kol., 2013; Mehle a kol., 2007; Myrta a kol., 2003; Rumbou a kol., 2008). Tato fytoplazma byla také nalezena v roce 1978 ve Velké Británii, následně zde byla vymýcena (Davies a kol., 1986).

3.5.5 Hospodářský význam fytoplazmy proliferace jabloně

'*Candidatus Phytoplasma mali*' je považována za jednoho z hospodářsky nejvýznamnějších patogenů jádovin v pěstitelských oblastech jižní a střední Evropy. V Itálii a Německu byly ekonomické ztráty v jabloňových sadech způsobené touto fytoplazmou odhadnuty na 100 milionů € ročně (Strauss, 2009). AP značně snižuje výnos a kvalitu ovoce. Hmotnost plodů je často snížena o 63-74 %, plody jsou špatně vybarvené a mají horší chuťovou kvalitu, což vede k tomu, že až 80 % je neprodejných (Kunze, 1976).

3.6 Genetická variabilita fytoplazmy proliferace jabloně

K identifikaci fytoplazem se používá gen pro 16S rRNA. Tento gen je však velmi konzervativní (Davis a kol., 2003; Duduk a kol., 2009; Jung a kol., 2003; Lee a kol., 1998; Liefting a kol., 1996; Schneider a Seemüller, 1994), proto se nehodí pro podrobnější rozlišení kmenů fytoplazem. Z tohoto důvodu je studována variabilita dalších genů a genomických oblastí, jako například sekvence genu pro nitroreductase-like protein, genu pro ribosomální proteiny *rpl22-rps3*, *secY*, *tuf*, *groEL* a dále intergenová oblast 16S-23S rRNA (Casati a kol., 2007; Jarausch a kol., 2000, 2004b; Lee a kol., 1994, 2004a,b, 2006b, 2010; Martini a kol., 2002, 2007a, 2008; Mitrovic' a kol., 2011; Schneider a kol., 1997; Smart a kol., 1996).

3.6.1 Gen pro 16S rRNA

Nejčastěji analyzovanou genomickou oblastí je oblast 16S-23S rDNA včetně intergenové oblasti. Analýza je založena na studiu variability P1/P7 fragmentu o délce 1,8 kb. Základem analýzy je zjišťování genetické variability pomocí restrikčních endonukleáz *HpaII* a *FauI*, kdy na základě získaných RFLP profilů je fytoplazma proliferace jabloně rozdělována do základních genotypů. Rozlišujeme dva restrikční profily: P-I a P-II. Oba tyto profily byly získány u kmenů '*Ca. Phytoplasma mali*' z Itálie, Maďarska a Srbska (Casati a kol., 2010; Paltrinieri a kol., 2010), Polska (Cieślińska a kol., 2012) a České republiky (Fránová a kol., 2013). Směsné infekce byly zaznamenány např. ve vzorcích z České republiky a Maďarska (Fránová a kol., 2013; Paltrinieri a kol., 2010). Vysoký stupeň genetické diverzity mezi populacemi '*Ca. Phytoplasma mali*' byl zjištěn v severozápadní Itálii (Casati a kol.,

2010). Profil P-I byl detekován ve většině vzorků z oblasti Trentino; profil P-II převládal ve vzorcích z oblasti Veneto. V Rumunsku byl profil P-I zaznamenán u většiny vzorků, zatímco profil P-II byl zjištěn pouze u izolátů z Bukurešti a B. Năsăud (Chireceanu a Ciešlińska, 2014).

3.6.2 Gen pro ribosomální proteiny rpl22-rps3

Molekulární charakterizace genu pro ribosomální proteiny pomocí *AluI*/RLFP analýzy amplikonů rpAP15f/rpAP15r umožnila rozlišovat čtyři různé restriční profily rpX-A, rpX-B, rpX-C a rpX-D. Všechny čtyři podskupiny byly detekovány u izolátů '*Ca. Phytoplasma mali*' v severovýchodní Itálii. Podtyp rpX-A se vyskytoval nejčastěji, zatímco výskyt podtypů rpX-C a rpX-D byl řídký. U jednoho izolátu podtypu rpX-A byla detekována směsná infekce s podtypem rpX-B (Martini a kol., 2008). Ve většině vzorků z regionu Veneto byla identifikována fytoplazma patřící do podskupiny rpX-D, kdežto podskupiny rpX-B a rpX-C byly identifikovány pouze v několika vzorcích z regionů Trentino a Veneto. U všech vzorků vykazujících profil P-I byla identifikována přítomnost fytoplazmy patřící do podskupiny rpX-A, zatímco ve vzorcích ukazujících profil P-II bylo možné rozlišit další tři rpX podskupiny (Paltrinieri a kol., 2010).

3.6.3 Gen pro nitroreductase-like protein

Analýzou genetické variability genu pro nitroreductase-like protein amplikonů AP14/AP15 byly pomocí restričních endonukláz *HincII* a *PagI* detekovány genotypy AT-1, AT-2, AP15 (Jarausch a kol., 1994, 2000).

Genotypy AT-1, AT-2, AP15 byly zjištěny v různých zemích Evropy. Podtypy AP15 a AT-2 se vyskytovaly ve Francii, Německu, Španělsku, Švýcarsku, Rakousku, Rumunsku a Itálii. Podtyp AT-1 se vyskytoval méně, byl detekován ve Francii a Německu. Podtyp AP15 představovalo více než 50 % izolátů jak ve Francii, tak i celkově, kdežto podtyp AT-1 byl mírně převládající v Německu. V experimentálních sadech v Bordeaux byly detekovány všechny tři podtypy a v komerčním sadu v Lot-et-Garonne dva různé podtypy (AP15 a AT-2) (Jarausch a kol., 2000).

Pozdější analýzy neribozomálních fragmentů DNA populací '*Ca. Phytoplasma mali*' ze severozápadní Itálie odhalily přítomnost tří podtypů fytoplazmy proliferace jabloně (AT-1, AT-2 a AP15), a byla hlášena identifikace dvou genetických linií izolátů fytoplazem v rámci podtypu AT-1, označované jako AT-1a a AT-1b (Casati a kol., 2010). Kmeny patřící

do podskupiny rpX-A vykazovaly následující genotypy: vzorkům ze Srbska patřil profil AP15, zatímco vzorky z regionu Trentino vykazovaly profil AT-2. Ve vzorcích z Maďarska byla identifikována přítomnost profilů AT-1, AT-2 a AP15 (Paltrinieri a kol., 2010).

3.6.4 Gen pro HflB proteasu

Molekulární analýzy genu pro HflB proteasu ATP00464 kmenů *'Ca. Phytoplasma mali'* odhalily sekvenční polymorfismy v rámci tohoto taxonu. Vysokého rozlišení genotypů *'Ca. Phytoplasma mali'* bylo dosaženo pomocí analýzy polymorfismu konformace jednovláknové DNA (SSCP) (Seemüller a kol., 2010; Schneider a Seemüller, 2009). *HflB* (synonymum *FtsH*) je ATP-dependentní membránově asociovaná Zn^{2+} proteáza spojená s degradací proteinů. Působí proti membránovým proteinům jako je SecY (Ito a Akiyama, 2005), a je tak přímo zapojena do membránového transportu hrajícího důležitou roli ve virulenci bakterií (Bonas, 1994). U většiny bakterií je gen pro hflB proteasu přítomen v jediné kopii, zatímco u fytoplazem byl identifikován v 6 až 24 kopiích (Arashida a kol., 2008; Bai a kol., 2006; Oshima a kol., 2004; Tran-Nguyen a kol., 2008).

Ve fragmentech genu pro HflB proteasu byly nalezeny konkrétní motivy, které souvisejí s příznakovostí fytoplazmy proliferace jabloně a na základě nich se dají rozdělit izoláty na slabě a silně virulentní, případně latentní infekce. Jedná se o motivy nukleotidové CTT184 a TAA184 na pozici 184-186, vyskytující se ve všech sekvencích, které rozlišují slabě a silně virulentní kmeny. Motiv CTT184, vyskytující se u silně virulentních kmenů, je podpořen nukleotidovými markery G215, A252, C267, A367 a A377, zatímco klasifikace některých slabě virulentních kmenů je podpořena motivem TTGCTGC227 na pozici 227-233. Dále se jedná o motivy proteinové, které pokrývají pouze polovinu kmenů, jsou však považovány za silnější než ty založené na synonymních mutacích. Aminokyselinové markery S72, S123, S126 a motiv F-A76 odpovídají nukleotidovým markerům G215, A367, A377 a motivu T-C277 (Seemüller a kol., 2011).

3.7 Fytoplazma proliferace jabloně v České republice

Příznaky infekce fytoplazmou proliferace jabloně byly v České republice poprvé zaznamenány v polovině dvacátého století., kdy byly ve starých sadech pozorovány lokální epidemie a nejčastějším způsobem šíření bylo roubování (Blatný a kol., 1963). Následně došlo k poklesu výskytu AP z důvodu používání zdravého rostlinného materiálu pro vegetativní množení. V 90. letech minulého století byl zaznamenán nárůst výskytu

fytoplazmy proliferace jabloně, který vedl až ke vzniku lokálních epidemií (Blažek a kol., 2005; Fialová a kol., 2003; Fránová a kol., 2008; Kučerová a kol., 2005; Navrátil a kol., 1998). AP se v České republice vyskytuje převážně ve starších výsadbách, soukromých zahradách, stromořadích a podél cest (Fialová a kol., 2003).

Analýzou genetické variability 16S-23S rDNA bylo zjištěno, že izoláty fytoplazmy proliferace jabloně detekované v České republice nejčastěji přísluší k profilu '2a' a P-I (Fránová a kol., 2013). Na základě variability dalších genů náležela většina detekovaných izolátů do podskupiny rpX-A, genotypů AP-15 a AT-2, a ostatní izoláty do podskupiny rpX-B, podtypu AT-1, který byl jen sporadicky detekován a je zřejmě častěji nacházen na Moravě (oblast s průměrnou vyšší teplotou) (Fránová a kol., 2013).

3.8 Latentní infekce

Fytoplazmy v latentním stádiu infekce nezpůsobují žádné symptomy na hostitelské rostlině. Výskyt latentní infekce byl dokázán úspěšným přenosem '*Candidatus Phytoplasma mali*' roubováním z nepříznakové jabloně (Seemüller a kol., 1984). Je možné, že asymptomatické rostliny jsou tolerantní, či v inkubační době. Infekce může být i po dlouhou dobu latentní nebo se projevuje jen na části koruny. Bylo zjištěno, že přítomnost '*Ca. Phytoplasma mali*' v koruně je spojena s expresí symptomů, zatímco u latentně infikovaných a ozdravených stromů zůstává patogen v kořeni (Carraro a kol., 2004).

Mnoho kultivarů nevykazuje typické příznaky (změny ve velikosti a počtu palistů a tvorba metlovitosti) v prvních letech vývoje stromu (Kartte a Seemüller, 1988, 1991a, 1991b; Schaper a Seemüller, 1982; Seemüller a kol., 1984a, 1984b). Fytoplazmy se mohou také vyskytovat u stromů, které vykazují atypické příznaky, jako například červenání listů a gumovitost (Bertaccini a kol., 2001). V případě projevu nespecifických symptomů musí být tedy zváženo možný výskyt latentní infekce. Posouzení na základě příznakovosti odráží skutečnou míru onemocnění určitého sadu (Baric a kol., 2007).

Zdánlivě zdravé stromy mohou být napadeny fytoplazmou, která se může nepozorovaně šířit vegetativním množением napadené rostliny i šťávu sajícím hmyzem. Bezpříznakové infekce jsou důležité pro ekologii a epidemiologii fytoplazmových onemocnění, jelikož latentně infikované rostliny mohou sloužit jako zdroj infekce (Brzin a kol., 2003; Cainelli a kol., 2004). Jejich včasná detekce a následné odstranění je stejně důležité jako intenzivní kontrola vektorů. To je významné zejména v nově založených sadech nebo v oblastech s vysokým výskytem onemocnění (Mehle a kol., 2010).

Expres příznaků je velmi variabilní, míra exprese příznaků se může značně lišit mezi jednotlivými stromy i rámci jednoho stromu v průběhu několika let. Přestože jabloně zůstávají infikovány fytoplazmou po celý svůj život, projev symptomů se může zmírnit i na několik vegetačních období nebo v některých případech nemusí onemocnění nikdy propuknout (Carraro a kol., 2004; Seemüller a kol., 1984). Kromě toho se předpokládá, že mnoho stromů je latentně infikovaných a příznaky onemocnění jsou viditelné teprve v důsledku speciálních klimatických podmínek nebo významných změn v produkčních postupech (Baric a kol., 2003). Pokud je rozmnožovací materiál infikován z podnože nebo štěpu, zpoždění exprese příznaků může být od pár měsíců po několik let (v závislosti na druhu a odrůdě), toto zpoždění komplikuje určení zdroje infekce v době, kdy se symptomy objeví (Giunchedi a Pollini, 2003).

Expres symptomů může záviset na stavu rostliny v době infekce a na titru počátečního inokula. Dá se spekulovat, že starší vitální rostlina infikovaná AP by se mohla lépe vyrovnat s patogenem a efektivněji potlačit příznaky nemoci, a to i na delší dobu. Na rozdíl od mladší rostliny, která má nejen menší množství biomasy, ale také trpí fyziologickým stresem v důsledku nedávné výsadby, se objeví příznaky dříve a výrazněji. Přenosové experimenty ve sklenících, jednak pomocí hmyzu i infikovaného rostlinného materiálu, ukázaly, že mladé stromy mohou vykazovat příznaky po minimální inkubační době čtyř až šesti měsíců (Carraro a kol., 2004; Frisinghelli a kol., 2000). Nicméně, v sadu může trvat období latence déle, dokonce i u mladších stromů (Baric a kol., 2007).

S cílem odhalit rozsah latentních infekcí fytoplazmou proliferace jabloně byly provedeny dvě studie v Jižním Tyrolsku. Byl studován sedmiletý komerční jabloňový sad, kde dosahovala míra latentní infekce 2,3 %. Bylo zjištěno, že skutečná míra infekce byla více než dvakrát vyšší než při posouzení monitorováním příznaků (Baric a kol., 2007). Druhá studie zahrnovala mladý sad, který byl vybrán, jelikož byly stromy napadeny merou *Cacopsylla picta* bezprostředně po výsadbě. Studie prokázala, že mladé jabloně byly latentně infikovány fytoplazmou proliferace jabloně po dobu nejméně 1,5 až 4 roky (Unterthurner a Baric, 2011). Fytoplazma proliferace jabloně byla studována také v České republice, kdy pozitivní testy na přítomnost fytoplazem u jabloní gumovitých a bezpříznakových naznačily možnost poměrně vysokého výskytu latentní infekce (Fialová a kol., 2003).

4 Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Byla provedena analýza výskytu a šíření fytoplazmy ve dvou sadech, které byly udržovány v odlišných systémech pěstování. Jeden sad byl v tzv. integrovaném systému pěstování (dále jen intenzivní sad) a druhý v přechodovém systému pěstování (dále jen ekologický sad). Vývoj příznaků byl sledován v obou sadech na rozloze zahrnující pět řad po padesáti stromech (tj. bylo hodnoceno celkem 250 stromů). S cílem vyhodnotit výskyt fytoplazmy proliferace jabloně a zjistit frekvenci výskytu latentních infekcí bylo odebráno po padesáti vzorcích v obou sledovaných sadech z jabloně domácí (*Malus domestica*). Vzorky byly odebírány v pěti řadách, přičemž z každého 5. stromu v řadě byly odebrány tři dvouleté větvičky. V intenzivním sadu byly navíc vybrány dva stromy, jelikož tyto stromy vykazovaly příznaky potencionálně vyvolané fytoplazmou proliferace jabloně. Odebrané vzorky byly označeny, vloženy do mikrotenových sáčků a uchovány v chladu.

4.2 Izolace DNA

DNA byla z jednotlivých vzorků izolována pomocí modifikované CTAB metody podle Ahrense a Seemüllera (1992).

Pomocí skalpelu bylo odebráno lýko ze tří větviček o délce přibližně 10 cm. Lýko bylo homogenizováno v cca 8 ml pufru Delaporta 1×. Homogenát byl centrifugován při 1000 g po dobu 4 min při 4 °C. Následně byl přefiltrován supernatant přes uhelon a centrifugován při 14000 g po dobu 25 min při 4 °C. Supernatant byl vylit a sediment resuspendován ve 2 ml roztoku Doyle-Doyle s merkptoethanolem (v poměru 500:1). Kyvety byly inkubovány 20 min ve vodní lázni při teplotě 60 °C. Byly přidány 2 ml směsi chloroform-izoamylalkohol (v poměru 24:1). Následně proběhla centrifugace při 6000 g po dobu 10 min při 4 °C. Do mikrozkuvek bylo odebráno po 0,5 ml čiré vodné fáze z kyvety. Do každé 1,5 ml mikrozkuvky byl přidán 1 ml izopropylalkoholu a byly přes noc umístěny při teplotě –20 °C. Následující den byly mikrozkuvky se vzorky centrifugovány při 18000 g po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl vylit a sediment byl promyt 1 ml 70% ethanolu. Následně proběhla centrifugace mikrozkuvek při 18000 g po dobu 10 min při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant vylit a vzorky byly ve vakuové odparce SpeedVac po dobu 30 min a při teplotě 45 °C.

4.3 PCR reakce

Pro amplifikace byla ve všech případech použita MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Všechny primery byly syntetizovány firmou GENERI BIOTECH s.r.o. Do reakce bylo použito 50–100 ng celkové DNA.

4.3.1 Detekce fytoplazmy

Přítomnost fytoplazmy byla detekována pomocí 'nested' PCR za použití univerzálních primerů P1/P7 a R16F2/R16R2 (Deng a Hiruki, 1991; Schneider a kol., 1995; Lee a kol., 1993). V prvním kroku ('direct') dvoukrokové PCR byly použity forward primer P1 a reverse primer P7. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 2. Vzorky byly amplifikovány za podmínek uvedených v Tab. 3. Produkty PCR byly následně naředěny 40× a takto naředěné PCR produkty byly použity jako templát v následné 'nested' PCR, kdy byl cílový fragment amplifikován pomocí forward primeru R16F2 a reverse primeru R16R2. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4. Podmínky PCR amplifikace jsou uvedeny v Tab. 3.

4.3.2 Studium genetické variability

Při studiu genetické variability detekovaných izolátů fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma mali' byla provedena amplifikace genu pro 16S-23S rRNA s primery P1/P7, F1/B6 a P1A/P7A (Deng a Hiruki, 1991; Schneider a kol., 1995; Davis a Lee, 1993; Padovan a kol., 1995; Lee a kol., 2004). V prvním kroku ('direct') dvoukrokové PCR byly použity forward primer P1 a reverse primer P7. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 2. Vzorky byly amplifikovány za podmínek uvedených v Tab. 3. Produkty PCR byly následně naředěny 40× a takto naředěné PCR produkty byly použity jako templát v následné 'nested' PCR, kdy byl cílový fragment amplifikován pomocí forward primeru F1 a reverse primeru B6. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4. Podmínky PCR amplifikace jsou uvedeny v Tab. 3. PCR produkty P1/P7 byly také použity jako templát v 'nested' PCR, kdy byl cílový fragment amplifikován pomocí forward primeru P1A a reverse primeru P7A. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4. Podmínky PCR amplifikace jsou uvedeny v Tab. 3.

U detekovaných izolátů fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' byla provedena amplifikace dalších cílových genů, a to genů ribosomální proteiny rpl22-rps3, nitroreductase-like protein a HflB proteasu.

Při amplifikaci genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3 byly použity primery rpAP15f/rpAP15r (Martini a kol., 2008). V jedнокrokové PCR byly použity forward primer rpAP15f a reverse primer rpAP15r. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 2. Vzorky byly amplifikovány za podmínek uvedených v Tab. 3.

Při amplifikaci genu pro nitroreductase-like protein byly použity primery AP13/AP10 a AP14/AP15 (Jarausch a kol., 2000; Casati a kol., 2010). V prvním kroku ('direct') dvoukrokové PCR byly použity forward primer AP13 a reverse primer AP10. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 2. Vzorky byly amplifikovány za podmínek uvedených v Tab. 3. Produkty PCR byly následně naředěny 40× a takto naředěné PCR produkty byly použity jako templát v následné 'nested' PCR, kdy byl cílový fragment amplifikován pomocí forward primeru AP14 a reverse primeru AP15. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 4. Podmínky PCR amplifikace jsou uvedeny v Tab. 3.

Při amplifikaci genu pro HflB proteasu byly použity primery fHflB3-1/rHflB3 (Schneider a Seemüller, 2009). V jedнокrokové PCR byly použity forward primer fHflB3-1 a reverse primer rHflB3. Byla připravena reakční směs dle počtu analyzovaných vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 2. Vzorky byly amplifikovány za podmínek uvedených v Tab. 3.

Tab. 2: Složení PCR reakční směsi pro 'direkt' PCR

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Na 1 test [μ l]
Pufr	5×	1 ×	4,00
Deionizovaná voda			13,40
f primer	20 pmol/ μ l	0,2 μ M	0,20
r primer	20 pmol/ μ l	0,2 μ M	0,20
Taq DNA polymeráza	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,20
Objem reakční směsi		18 μ l	
Objem vzorku		2 μ l	
Objem reakce		20 μ l	

Vysvětlivky: f primer - forward primer (P1, AP13, AP15f, fHflB3-1)
 r primer - reverse primer (P7, AP10, AP15r, rHflB3)

Tab. 3: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakcí

Jednotlivé kroky	Primery	Teplota/ doba	Počet cyklů
Počáteční denaturace	Všechny	95 °C/ 2 min	1×
Denaturace	AP13/10, AP14/15	95 °C/ 30 s	35×
	P1/P7, R16F2/R16R2, F1/B6, P1A/P7A, rpAP15f/rpAP15r, fHflB3-1/rHflB3	95 °C/ 1 min	
Nasedání primerů	fHflB3-1/rHflB3	48 °C/ 1 min	
	R16F2/R16R2	50 °C/ 1 min	
	F1/B6	50 °C/ 2 min	
	rpAP15f/rpAP15r	55 °C/ 45 s	
	P1/P7, P1A/P7A	55 °C/ 1 min	
	AP13/10, AP14/15	58 °C/ 30 s	
Syntéza	R16F2/R16R2, AP13/10, AP14/15, rpAP15f/rpAP15r, fHflB3-1/rHflB3	72 °C/ 1 min	
	P1/P7, F1/B6, P1A/P7A	72 °C/ 3 min	
Dosyntetizování řetězců	Všechny	72 °C/ 7 min	1×

Tab. 4: Složení PCR reakční směsi pro 'nested' PCR

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Na 1 test [μ l]
Pufr	5×	1 ×	5,00
Deionizovaná voda			17,30
f primer	20 pmol/ μ l	0,2 μ M	0,25
r primer	20 pmol/ μ l	0,2 μ M	0,25
Taq DNA polymeráza	5 U/ μ l	1 U/reakce	0,20
Objem reakční směsi		23 μ l	
Objem vzorku		2 μ l	
Objem reakce		25 μ l	

Vysvětlivky: f primer - forward primer (R16F2, F1, P1A, AP14)

r primer - reverse primer (R16R2, B6, P7A, AP15)

Tab. 5: Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
gen pro 16S-23S rRNA			
P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	cca 1800	Deng a Hiruki, 1991; Schneider a kol., 1995
R16F2 R16R2	ACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	cca 1200	Lee a kol., 1993
F1 B6	AAGACGAGGATAACAGTTGG TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	cca 1650	Davis a Lee, 1993 Padovan a kol., 1995
P1A P7A	ACGCTGGCGGGCGCGCCTAATAC CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	cca 1800	Lee a kol., 2004
fU5	CGGCAATGGAGGAAACT		Lorenz a kol., 1995
M1	GTCTTTACTGACGCTAGGC		Gibb a kol., 1995
gen pro nitroreductase-like protein			
AP13 AP10	CTACAGATTTACACATTGG TTTTCAACCGTATTCCGCC	cca 800	Jarausch a kol., 2000
AP14 AP15	CAGATTTACACATTGGTTAT ATTTTTGTTGTTTTCTACCCAT	cca 800	Casati a kol., 2010
gen pro ribosomální proteiny rpl22-rps3			
rpAP15f rpAP15r	AGTGCTGAAGCTAATTTGG TGCTTTTTATAGCAAAAGGTT	cca 900	Martini a kol., 2008
gen pro HflB proteasu			
fHflB3-1 rHflB3	TTCTAGCTATTCATCGTGAA CGGCGGATTAGTAGCTCC	cca 500	Schneider a Seemüller, 2009

4.4 Vyhodnocení výsledků PCR reakce pomocí elektroforetické separace

Úspěšnost PCR reakce byla vyhodnocena elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Jeho zásobní roztok byl připraven smícháním a následným rozehrátím 3 g agarózy (Agarose I, Amresco®) s 300 ml TAE (1×) pufru v mikrovlnné troubě. Z připraveného zásobního roztoku agarózového gelu bylo použito 50 ml gelu, do kterého byly přidány 3 µl fluorescenčního barviva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, SBS Genetech). Elektroforetická separace probíhala přibližně 30–45 min při stejnosměrném napětí 80 V. Poté byly PCR produkty vizualizovány pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentovány programem GeneSnap (Syngene).

4.5 Identifikace fytoplazem pomocí RFLP

PCR produkty detekované fytoplazmy byly identifikovány pomocí RFLP analýzy, kdy byly R16F2/R16R2 produkty štípany pomocí specifických restrikčních endonukleáz *RsaI*, *MseI*, *BfmI* a *SspI*. Byla připravena reakční směs (Tab. 6, 7) pro daný počet analyzovaných vzorků, ta byla rozpipetována a k reakční směsi bylo přidáno 5 µl PCR produktu. Zkumavky byly inkubovány přes noc v termobloku při 37 °C.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro RFLP při použití restrikčních endonukleáz *BfmI* a *SspI*

Položka	Množství na 1 test [µl]
RE pufr 10×	1,3
Deionizovaná voda	6,5
Restrikční endonukleáza	0,2
PCR produkt	5

Tab. 7: Složení reakční směsi pro RFLP při použití restrikčních endonukleáz *RsaI*, *MseI*

Položka	Množství na 1 test [µl]
RE pufr 10×	1,3
BSA (10×)	1,3
Deionizovaná voda	5,2
Restrikční endonukleáza	0,2
PCR produkt	5

Výsledek RFLP byl vyhodnocen pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu v TAE pufru a na základě zjištěných profilů byla identifikována fytoplazma. Jeho zásobní roztok byl připraven smícháním a následným rozehrátím 6 g agarózy (Agarose I, Amresco®) s 300 ml TAE (1×) pufru v mikrovlnné troubě. Z připraveného zásobního roztoku agarózového gelu bylo použito 50 ml gelu, do kterého byly přidány 3 µl barviva GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium). Elektroforetická separace probíhala při 60 V po dobu přibližně 60 min a výsledek byl vizualizován pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentován programem GeneSnap (Syngene).

4.6 Genotypizace

U identifikovaných fytoplazem byla studována genetická variabilita izolátů na základě genů pro 16S-23S rRNA, ribosomální proteiny *rpl22-rps3* a nitroreductase-like protein. Genotypizace byla provedena pomocí restrikční analýzy se specifickými restrikčními endonukleázami. F1/B6 produkty byly štípány pomocí restrikční endonukleázy *HpaII*, P1A/P7A produkty pomocí restrikčních endonukleáz *HpaII* a *FauI*, rpAP15f/rpAP15r produkty pomocí restrikční endonukleázy *AluI* a AP14/AP15 produkty pomocí restrikčních endonukleáz *PagI* a *HincII*. Pro analýzy pomocí jednotlivých restrikčních endonukleáz byla připravena reakční směs pro daný počet analyzovaných vzorků, ta byla rozpipetována a k reakční směsi bylo přidáno 5 µl PCR produktu. Složení reakční směsi při použití restrikčních endonukleáz *HpaII*, *FauI*, *HincII* a *PagI* bylo stejné jako v případě restrikčních endonukleáz *BfmI* a *SspI* (Tab. 6). Složení reakční směsi při použití restrikční endonukleázy *AluI* bylo stejné jako v případě restrikčních endonukleáz *RsaI*, *MseI* (Tab. 7). Zkumavky byly inkubovány přes noc v termobloku při 37 °C.

Výsledek restrikční analýzy se specifickou restrikční endonukleázou *FauI* byl vyhodnocen pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu v TAE pufru. Jeho zásobní roztok byl připraven smícháním a následným rozehrátím 6 g agarózy (Agarose I, Amresco®) s 300 ml TAE (1×) pufru v mikrovlnné troubě. Z připraveného zásobního roztoku agarózového gelu bylo použito 50 ml gelu, do kterého byly přidány 3 µl barviva GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium). Elektroforetická separace probíhala při 60 V po dobu přibližně 60 min a výsledek byl vizualizován pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentován programem GeneSnap (Syngene).

Produkty restrikční analýzy se specifickými restrikčními endonukleázami *HpaII*, *HincII*, *PagI* a *AluI* byly separovány v 8% polyakrylamidovém gelu v TBE pufru. 10 ml 8%

polyakrylamidového gelu bylo připraveno smícháním 5,8 ml destilované vody; 2 ml 5× TBE pufru; 2 ml N,N'-metylen-bis-akrylamidu (roztok 19:1, Serva); 10 µl N,N,N',N'-tetramethyletylendiaminu (TEMED) (Serva); 200 µl 10% amonium persulfátu (APS). Elektroforéza probíhala při 50 V po dobu 90 min. Gel byl následně barven v roztoku barviva GelRed (3,3x) za stálého míchání (50 rpm) po dobu 45 min. Výsledek byl vizualizován pomocí UV transluminátoru (G:Box, Syngene) a dokumentován programem GeneSnap (Syngene).

4.7 Izolace PCR produktu z gelu

PCR produkty určené pro sekvenování byly izolovány pomocí komerčního kitu QIAquick Gel Extraction KIT podle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu s přidavkem 6 µl ethidium bromidu (10 mg/ml) v prostředí TAE pufru při 80 V po dobu 45 min. Za procházejícího UV světla byl pomocí sterilního skalpelu vyříznut PCR produkt. Byl přidán QG pufr v objemovém poměru 3:1. Následně byl gel s QG pufrem inkubován 10 min při 50 °C. Ke směsi byl přidán 1 objem isopropanolu. Do kolonky bylo napipetováno maximálně 700 µl směsi. Byla provedena centrifugace při 13000 rpm po dobu 1 min. Obsah sběrné zkumavky byl vylit. Pokud bylo směsi více, krok byl zopakován. Posléze bylo do kolonky přidáno 500 µl QG pufru. Směs byla centrifugována při 13000 rpm po dobu 1 min. Obsah sběrné zkumavky byl vylit. Do kolonky bylo přidáno 750 µl PE pufru a byla opětovně centrifugována (13000 rpm/1 min). Po vylití obsahu sběrné zkumavky byla prázdná kolonka opět centrifugována (13000 rpm/1 min). Na kolonku bylo nanášeno 30 µl destilované vody a kolonka byla znovu centrifugována (13000 rpm/1 min).

Koncentrace vyizolované DNA byla stanovena fluorometricky pomocí fluorometru (Hofer DyNA Quant 200).

4.8 Sekvenační značení

Byly sekvenovány PCR produkty genů pro 16S-23S rRNA, ribosomální proteiny rpl22-rps3, nitroreductase-like protein a HflB proteasu. V závislosti na délce analyzovaného fragmentu bylo pro sekvenační značení použito různé množství templátové DNA (Tab. 8). V případě genu pro 16S-23S rRNA bylo do sekvenační reakce použito 40 ng templátové DNA u fragmentu F1/B6 a 50 ng templátové DNA u fragmentu P1A/P7A. Fragment F1/B6

byl sekvenován pomocí primerů F1, B6, fU5, M1, R16R2. Fragment P1A/P7A byl sekvenován pomocí primerů P1A, P7A, R16F2, R16R2, M1, fU5. V případě fragmentu rpAP15f/rpAP15r genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3 bylo do sekvenační reakce použito 35 ng templátové DNA. Fragment rpAP15f/rpAP15r byl sekvenován pomocí primerů rpAP15f, rpAP15r. Fragment AP14/AP15 genu pro nitroreductase-like protein byl sekvenován pomocí primerů AP14, AP15, přičemž do sekvenační reakce bylo použito 30 ng templátové DNA. V případě genu pro HflB proteasu bylo do sekvenační reakce použito 30 ng templátové DNA. Fragment fHflB3-1/rHflB3 byl sekvenován pomocí primerů fHflB3-1, rHflB3.

Tab. 8: Množství templátové DNA pro jednotlivé fragmenty genů

Sekvenační primer	Množství templátové DNA [ng]
fragment genu pro 16S-23S rRNA	
F1, B6	40
P1A, P7A	50
fragment genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3	
rpAP15f, rpAP15r	35
fragment genu pro nitroreductase-like protein	
AP14, AP15	30
fragment genu pro HflB proteasu	
fHflB3-1, rHflB3	30

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems™) podle modifikovaného postupu doporučeného výrobcem. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 9. Templátová DNA obsahuje cílové množství DNA naředěné v 6 µl. Podmínky sekvenační reakce jsou uvedeny v Tab. 10. Samotná sekvenační analýza byla realizována pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 (PE Applied Biosystems, USA) na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci.

Tab. 9: Složení reakční směsi pro sekvenační značení

Položka	Množství na 1 test [µl]
Pufr 10x	1
BigDye	1
Primer (1,6 pmol/µl)	2
Templátová DNA	6
Celkový objem reakce	10

Tab. 10: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro sekvenční značení

Teplota	Doba	Počet cyklů
96 °C	1 min	1×
96 °C	10 s	35×
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
10 °C	10 min	1×

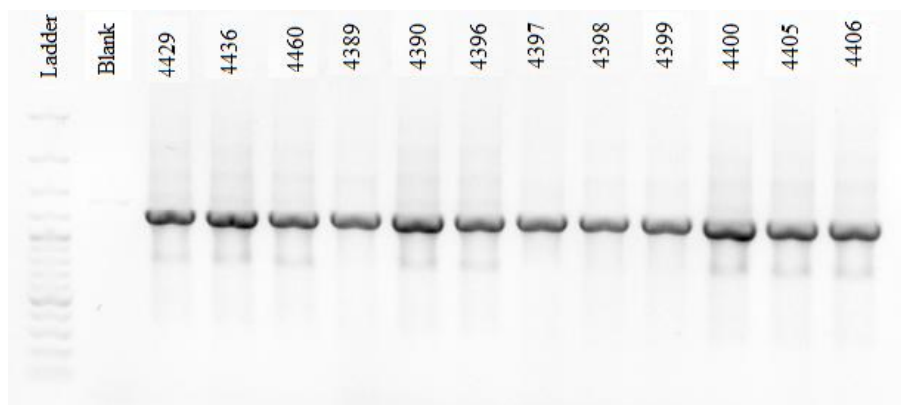
4.9 Analýza sekvencí DNA

Jednotlivé sekvenační výstupy byly složeny do konečné sekvence ('contig') pomocí programu Seqman (DNASTAR, Lasergene). Jejich identita byla potvrzena porovnáním se známými sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu Blast (BLAST, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Získané sekvence byly vzájemně porovnány se sekvencemi příslušícími k fytoplazmě proliferace jabloně dostupnými databázi GenBank. Pomocí algoritmu ClustalW byly ze získaných sekvencí jednotlivých vzorků vytvořeny mnohočetné aligmenty. Genetická variabilita izolátů a jejich fylogenetické vztahy byly následně analyzovány pomocí modelu metody neighbor-joining analýzy, bootstrap opakování 500×. Získaný fylogenetický strom byl vizualizován pomocí TreeExplorer (všechny analýzy Mega 5.05, Tamura a kol., 2011).

5 Výsledky

S cílem vyhodnotit výskyt fytoplazmy proliferace jabloně a zjistit frekvenci výskytu latentních infekcí ve dvou sledovaných sadech bylo odebráno po 50 vzorcích v ekologickém a intenzivním sadu z jabloně domácí (*Malus domestica*). V intenzivním sadu byly navíc vybrány 2 stromy, jelikož tyto stromy vykazovaly příznaky potencionálně vyvolané fytoplazmou proliferace jabloně. Ze vzorků jabloní byla úspěšně vyizolována celková DNA.

Fytoplazma byla pomocí 'nested' PCR detekována ve dvanácti vzorcích jabloní, ve všech případech byly získány produkty očekávané velikosti 1200 bp (Obr. 1). Na základě restrikční analýzy pomocí restrikčních endonukleáz *BfmI*, *MseI*, *RsaI* a *SspI* byla ve všech případech identifikována fytoplazma proliferace jabloně (Obr. 2, 3). Deset jabloní nevykazovalo příznaky napadení fytoplazmou, dvě jabloně vykazovaly příznaky, přičemž u izolátu 4390 byly pozorovány příznaky mírné proliferace a izolát 4429 vykazoval atypické příznaky, bylo pozorováno červenání listů (Tab. 11).



Obr. 1: Detekce fytoplazmy ve vzorcích jabloní pomocí PCR s primery R16F2/R16R2

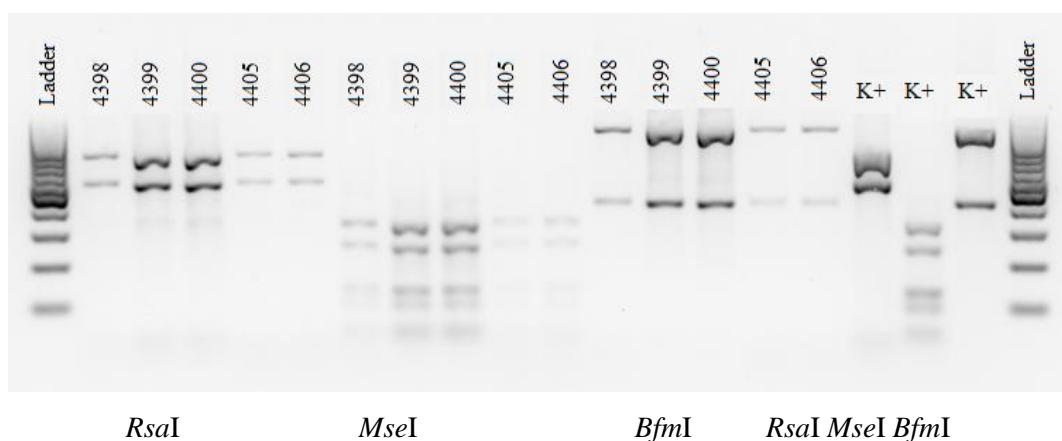
Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas

4429-4406 - čísla vzorků

Blank - negativní kontrola

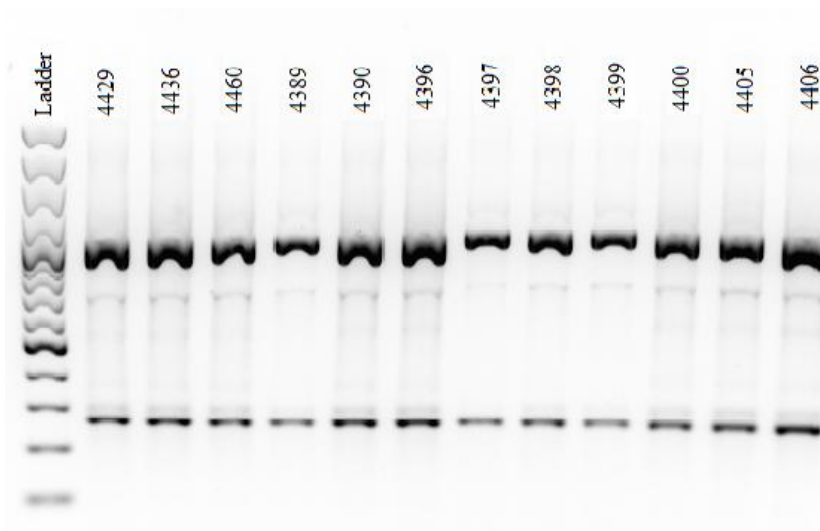
Tab. 11: Seznam a lokalizace vzorků pozitivních na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně

Číslo vzorku	Lokalita odběru
4429	Intenzivní sad, Kozov
4436	Intenzivní sad, Kozov
4460	Intenzivní sad, Kozov
4389	Ekologický sad, Kozov
4390	Ekologický sad, Kozov
4396	Ekologický sad, Kozov
4397	Ekologický sad, Kozov
4398	Ekologický sad, Kozov
4399	Ekologický sad, Kozov
4400	Ekologický sad, Kozov
4405	Ekologický sad, Kozov
4406	Ekologický sad, Kozov



Obr. 2: RFLP profily R16F2/R16R2 produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikčních endonukleáz *RsaI*, *MseI* a *BfmI*

Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas
 4398-4406 - čísla vzorků
 K+ - pozitivní kontrola



Obr. 3: RFLP profily R16F2/R16R2 produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *SspI*

Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas
4429-4406 - čísla vzorků

Byla studována genetická variabilita izolátů na základě genotypizace konkrétních genů, a to genů pro 16S-23S rRNA (*HpaII*, *FauI*), ribosomální proteiny rpl22-rps3 (*AluI*) a nitroreductase-like protein (*PagI*, *HincII*).

Byla provedena analýza genu pro 16S-23S rRNA. U dvanácti vzorků byl analyzován fragment F1/B6. *HpaII*/RFLP analýzou byl v šesti případech detekován profil I (Tab. 12), u třech případů byl detekován profil II, ve třech případech byla zjištěna směsná infekce (Obr. 4). U 9 vzorků byl analyzován fragment P1A/P7A. Pomocí *FauI*/RFLP analýzy byl ve všech případech detekován genotyp A (Obr. 5). *HpaII*/RFLP analýzou byl ve čtyřech případech detekován profil I, u třech případů byl detekován profil II, ve dvou případech byla zjištěna směsná infekce (Obr. 6).

U 9 vzorků byl analyzován fragment AP14/AP15 pomocí RFLP analýzy s použitím restrikčních endonukleáz *HincII* a *PagI*. Analýzou fragmentu genu pro nitroreductase-like protein bylo zjištěno, že tři izoláty přísluší k profilu AT-1, u dvou případů byl detekován profil AT-2, u tří případů byl detekován profil AP15, v jednom případě byla zjištěna směsná infekce, přítomnost dvou profilů (AP15 + AT-2) ve vzorku (Obr. 7, 8). Gen nitroreductase-like protein vykazoval nejvyšší variabilitu.

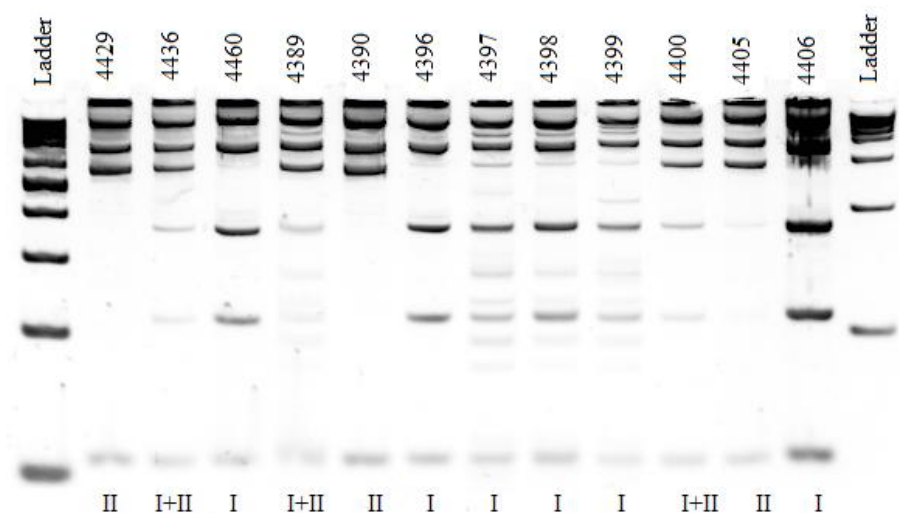
U 9 vzorků byl studován fragment rpAP15f/rpAP15r genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3. Pomocí *AluI*/RFLP analýzy byly izoláty rozděleny do dvou skupin, v šesti

případech byl detekován profil A a u třech případů byl detekován profil B (Obr. 9). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 12.

Tab. 12: Genetická variabilita izolátů na základě genotypizace konkrétních genů

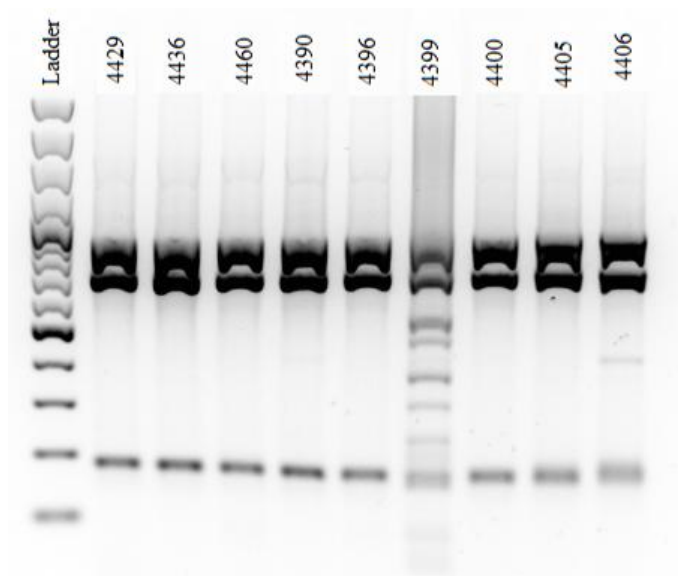
Izolát	gen pro 16S-23S rRNA			gen pro nitroreductase-like protein	gen pro ribosomální proteiny rpl22-rps3
	F1/B6 (<i>HpaII</i>)	P1A/P7A (<i>FauI</i>)	P1A/P7A (<i>HpaII</i>)	AP14/AP15 (<i>HincII</i> , <i>PagI</i>)	rpAP15f/ rpAP15r (<i>AluI</i>)
4429	II	A	II	AP15	A
4436	I + II	A	I + II	AT-1	B
4460	I	A	I	AP15	A
4389	I + II	-	-	AT-1	B
4390	II	A	II	AT-1	B
4396	I	A	I	AT-2	A
4397	I	-	-	-	-
4398	I	-	-	-	-
4399	I	A	I	-	-
4400	I + II	A	I + II	AT-2	A
4405	II	A	II	AP15 + AT-2	A
4406	I	A	I	AP15	A

Vyvětlivky: - nebyl získán produkt



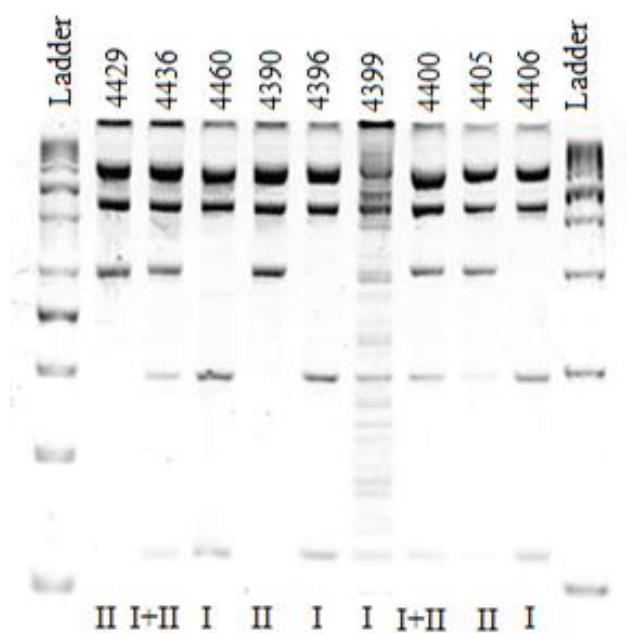
Obr. 4: RFLP profily F1/B6 produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restriční endonukleázy *HpaII*

Vysvětlivky: Ladder - vlevo Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas
 - vpravo Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas
 4429-4406 - čísla vzorků
 I, II, I+II – označení RFLP profilu



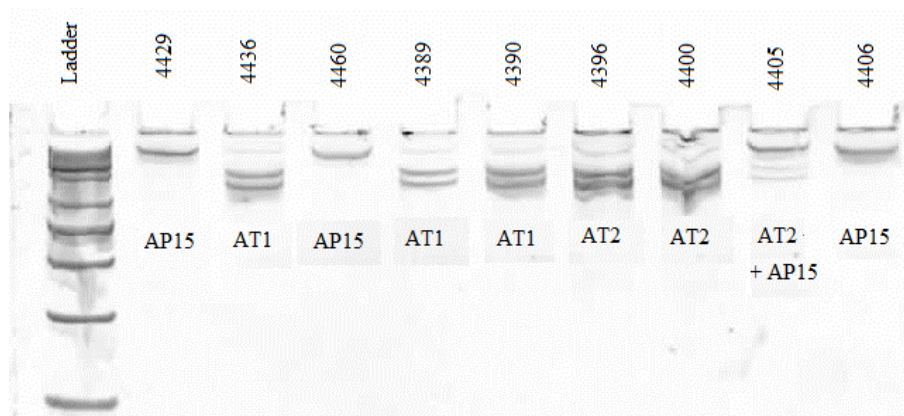
Obr. 5: RFLP profily P1A/P7A produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *FaeI*

Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas
4429-4406 - čísla vzorků



Obr. 6: RFLP profily P1A/P7A produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *HpaII*

Vysvětlivky: - vlevo Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas
- vpravo Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas
4429-4406 - čísla vzorků
I, II, I+II – označení RFLP profilu

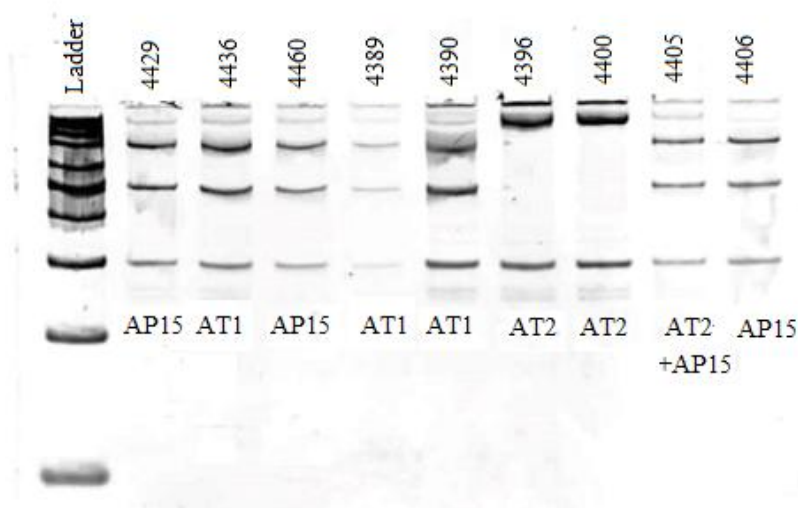


Obr. 7: RFLP profily AP14/AP15 produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *HincII*

Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas

4429-4406 - čísla vzorků

AT-1, AT-2, AP15 – označení RFLP profilu

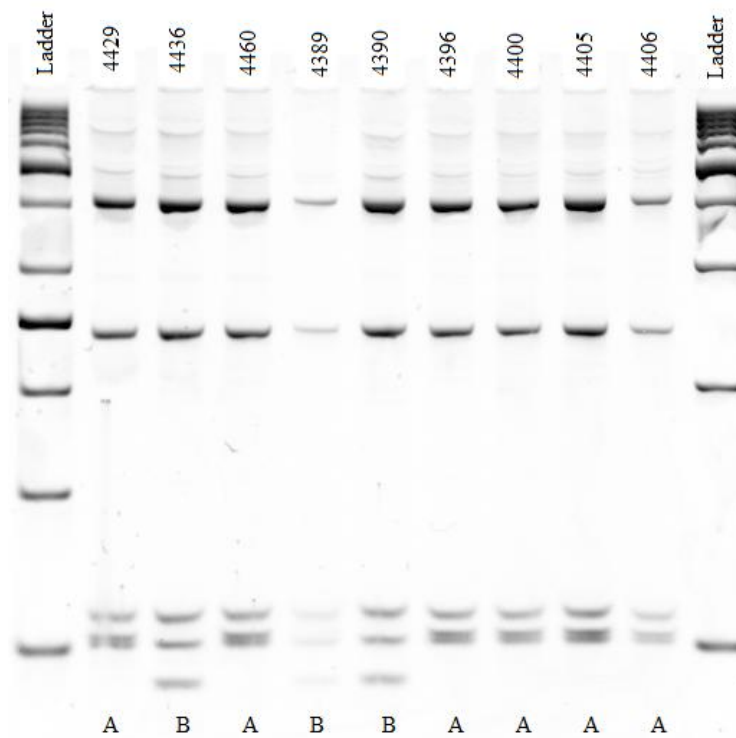


Obr. 8: RFLP profily AP14/AP15 produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *PagI*

Vysvětlivky: Ladder - Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas

4429-4406 - čísla vzorků

AT-1, AT-2, AP15 – označení RFLP profilu



Obr. 9: RFLP profily *rpAP15f/rpAP15r* produktů izolátů fytoplazmy proliferace jabloně při použití restrikční endonukleázy *AluI*

Vysvětlivky: Ladder - vlevo Gene Ruler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas
 - vpravo Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas
 4429-4406 - čísla vzorků
 A, B - označení RFLP profilu

Ve všech dvanácti případech, kdy byla dekována fytoplazma proliferace jabloně, byly získány sekvence genu pro 16S-23S rRNA pokrývající téměř celou oblast P1/P7 o délce 1580-1675 bp. Jejich porovnáním se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank pomocí programu Blast byla potvrzena jejich příslušnost k fytoplazmě proliferace jabloně. Všechny izoláty vykazovaly vysokou (99%) identitu s referenční sekvencí '*Candidatus* Phytoplasma mali', izolát AT (Acc. No. X68375.2) a dalšími sekvencemi stejného druhu např. izoláty 6K, 147, 472 (Acc. No. KJ676479.1, EF392656.1, KJ676480.1). V databázi je dostupná sekvence izolátu fytoplazmy proliferace jabloně "Kozov758", která pochází ze stejné lokality. Získané sekvence P1/P7 vykazovaly 99% identitu se sekvencí izolátu "Kozov758" (Acc. No. AY900009.1), původem z rybízu červeného. Podle očekávání bylo potvrzeno, že gen pro 16S-23S rRNA je velmi konzervativní. Bylo zaznamenáno minimum záměn. V získaných sekvencích byly detekovány 2 záměny, substituce T za C u izolátů 4390, 4405, 4429, 4436 v pozici 1589 referenční sekvence, u ostatních 8 izolátů tato substituce nebyla, a substituce T za C u izolátu 4460 v pozici 1420 referenční sekvence. Při porovnání sekvencí byla

nalezena charakteristická štěpná místa pro enzym *HpaII* u izolátů 4389, 4396, 4397, 4398, 4399, 4400, 4406, 4460. Rozdělení bylo v souladu s genotypizací pomocí RFLP s restričními endonukleázami *HpaII* a *FauI*.

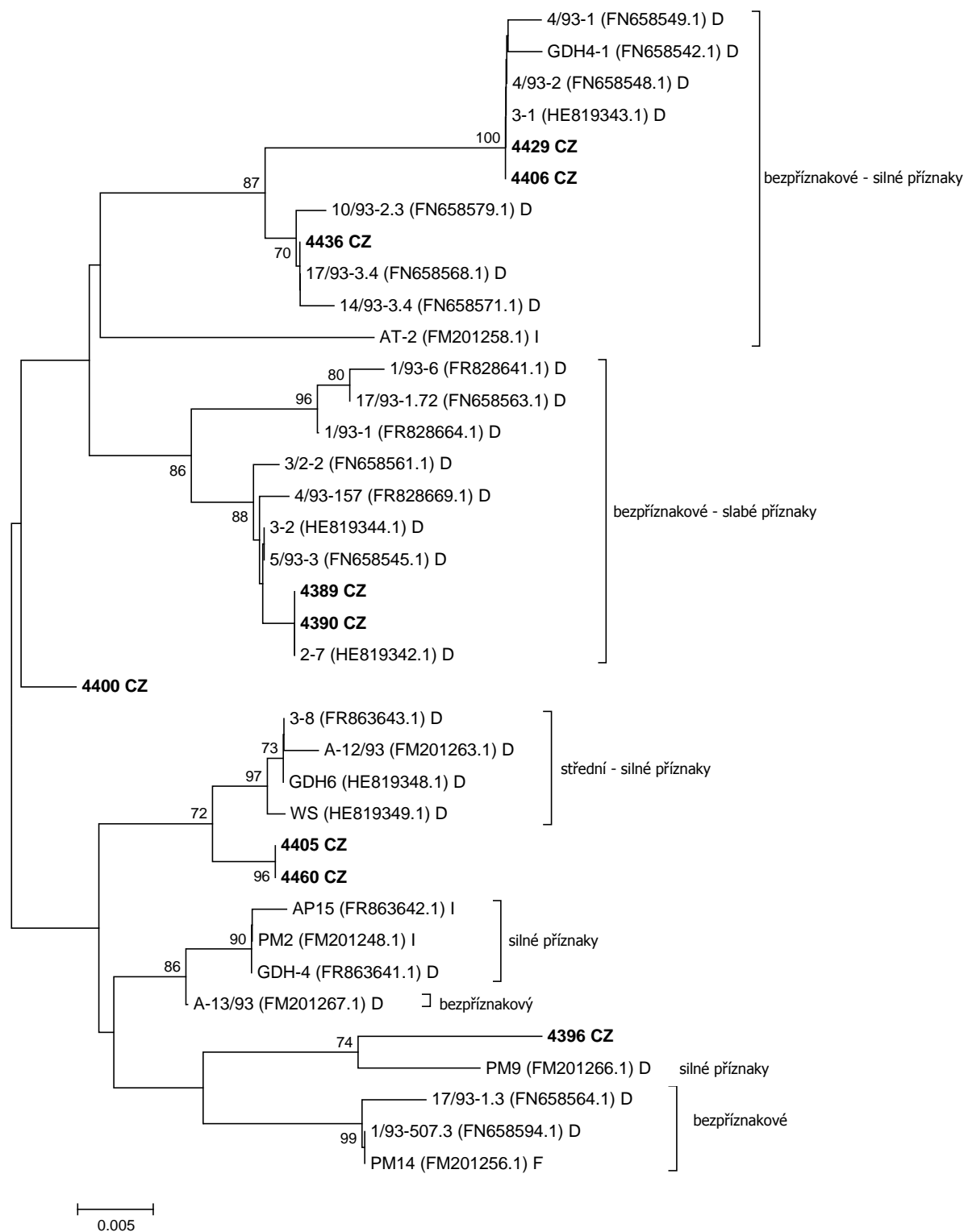
Studované izoláty genu pro ribosomální proteiny *rpl22-rps3* vykazovaly vysokou (99%) identitu s referenční sekvencí '*Candidatus Phytoplasma mali*', izolát AT (Acc. No. EF193367.1) a dalšími sekvencemi stejného druhu např. izoláty GDel, 149/2010, J4020 (Acc. No. HG798800.1, JN606866.1, HG798804.1). Podařilo se získat celý fragment o odpovídající délce. Získané izoláty se lišily přítomností inserce a rozdělily se do dvou skupin, na sekvence o délce 920 nukleotidů a délce 908 nukleotidů. U izolátů 4396, 4400, 4429 a 4460 byla detekovaná inserce dvanácti nukleotidů v pozici 200-211 referenční sekvence. Izoláty 4390 a 4436 vytvořily druhou skupinu izolátů a tato inserce u nich nebyla detekována. Při porovnání sekvencí byla nalezena charakteristická štěpná místa pro enzym *AluI*. Rozdělení bylo v souladu s genotypizací pomocí RFLP s restriční endonukleázou *AluI*.

Sekvence pokrývající oblast genu pro nitroreductase-like protein byly získány u devíti z dvanácti izolátů, ve všech případech se podařilo získat sekvenci o délce 717 bp. Získané sekvence vykazovaly vysokou (100%) identitu s referenční sekvencí fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*', izolát AT-2 (Acc. No. JN642113.1) a 99-100% identitu s dalšími sekvencemi stejného druhu např. izoláty J8148, GIP, J4020 (Acc. No. HG423131.1, HG423133.1, HG798805.1). V analyzovaných sekvencích byly detekovány 3 variabilní pozice, substituce G za A u izolátu 4406 v pozici 240 referenční sekvence, substituce A za C u izolátů 4396 a 4400 v pozici 340 referenční sekvence a substituce C za G u izolátů 4405, 4406 a 4429 v pozici 376 referenční sekvence. Při porovnání sekvencí byla nalezena charakteristická štěpná místa pro enzymy *HincII* u izolátů 4390, 4396, 4400, 4436 a *PagI* u izolátů 4390, 4405, 4406, 4429, 4436. Sekvenční variabilita byla v souladu s variabilitou genu nitroreductase-like protein zjištěnou pomocí RFLP analýzy s restričními endonukleázami *HincII* a *PagI*.

Byly získány sekvence genu pro HflB proteasu u devíti z dvanácti izolátů, jejich délka byla 528 bp. Získané sekvence vykazovaly vysokou (99%) identitu s referenční sekvencí fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*', izolát AP-15 (Acc. No. FR863642.1) a dalšími sekvencemi stejného druhu, např. izoláty 2-7, 3-2, 17/93-3.4 (Acc. No. HE819342.1, HE819344.1, FN658568.1). Mezi získanými sekvencemi byla zaznamenána značná variabilita. Na základě fyto genetické analýzy se izoláty vyvětvily do sedmi skupin (Obr. 10). Jednu větev, statisticky průkaznou, tvořily bezpříznakové až silně příznakové izoláty, tato větev zahrnovala izoláty původem z Německa a získané izoláty 4406, 4429,

4436. Izolát 4429 vykazoval atypické příznaky, bylo pozorováno červenání listů, ostatní izoláty příznaky nevykazovaly. Bezpříznakový izolát 4389 a slabě příznakový izolát 4390 se vyvětvily ve druhé, statisticky průkazné skupině společně s bezpříznakovými a slabě příznakovými izoláty původem z Německa. Oba izoláty vykazovaly největší vzájemnou příbuznost s mírně virulentním izolátem 2-7 (Acc. No. HE819342.1) původem z Německa. Izolát 4400 tvořil třetí samostatnou skupinu. Izoláty 4405 a 4460 se vyvětvily ve čtvrté, statisticky průkazné skupině společně se středně a silně virulentními izoláty původem z Německa. Pátou skupinu tvořily silně virulentní izoláty původem z Německa a Itálie, včetně referenční sekvence '*Candidatus* Phytoplasma mali', izolát AP15 (Acc. No. FR863642.1) původem z Itálie a bezpříznakový izolát z Německa. Izolát 4396 se vyvětvil do šesté, statisticky průkazné skupiny společně se silně virulentním izolátem PM9 (Acc. No. FM201266.1) původem z Německa. Poslední sedmou skupinu tvořily bezpříznakové izoláty původem z Německa a Francie.

Analýzou sekvencí genu pro HflB proteasu byly u studovaných izolátů nalezeny konkrétní motivy, které jsou spojovány s příznakovostí fytoplazmy proliferace jabloně a na základě nich se dají rozdělit izoláty na slabě a silně virulentní, případně latentní infekce. Jedná se o motivy nukleotidové CTT184 a TAA184, vyskytující se ve všech sekvencích, které rozlišují slabě a silně virulentní kmeny. Na jejich základě bylo zjištěno, izoláty 4389, 4390, 4396 a 4400 nesou motiv typický pro slabě virulentní izoláty a izoláty 4405, 4406, 4429, 4436, 4460 nesou motiv typický pro silně virulentní izoláty. Motiv TAA184, vyskytující se u slabě virulentních kmenů, byl u izolátu 4396 podpořen motivem odpovídajícím motivu TTGCTGC227 na pozici 227-233. Motiv CTT184, vyskytující se u silně virulentních kmenů, byl navíc podepřen jedním až třemi nukleotidovými markery. U izolátu 4405 byl nalezen motiv odpovídající markeru A252, u izolátů 4406 a 4429 byl motiv CTT184 podepřen třemi dalšími motivy odpovídající markerům G215, A367, A377, u izolátů 4436 byl nalezen motiv odpovídající markeru G215 a u izolátu 4460 byl nalezen motiv odpovídající markeru A252. Přítomnost motivů nebyla v souladu s pozorovanými symptomy, jelikož izolát 4390, který vykazoval příznaky, nesl motiv typický pro slabě virulentní izoláty. Izoláty 4405, 4406, 4436, 4460 nesoucí motiv typický pro silně virulentní izoláty příznaky nevykazovaly.



Obr. 10: Dendrogram izolátů fytoplazmy proliferace jabloně sestavený na základě neighbor joining analýzy genu pro HflB proteasu (Jednotlivé izoláty označeny názvem izolátu, GenBank Acc. No. a zemí původu [CZ – Česká republika, D – Německo, F – Francie, I – Itálie]. Úsečka znázorňuje procento nukleotidových substitucí, znázorněny hodnoty bootstrap ≥ 70 .)

6 Diskuze

'*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca. Phytoplasma mali*') je původce fytoplazmy proliferace jabloně (AP), která je jedním z nejvýznamnějších fytoplazmových onemocnění v Evropě (Seemüller a kol., 2011). V 90. letech minulého století byl zaznamenán nárůst výskytu fytoplazmy proliferace jabloně České republiky, který vedl až ke vzniku lokálních epidemií (Blažek a kol., 2005; Fialová a kol., 2003; Fránová a kol., 2008; Kučerová a kol., 2005; Navrátil a kol., 1998). AP se v České republice vyskytuje převážně ve starších výsadbách, soukromých zahradách, stromořadích a podél cest (Fialová a kol., 2003).

V souboru analyzovaných stromů bylo detekováno vyšší procento výskytu fytoplazmy proliferace jabloně v sadu v ekologickém systému pěstování (18 %) ve srovnání se sadem v intenzivním systému pěstování (5,8 %). Zjištěný výskyt odpovídá zjištěním Seemüllera a kol. (1998a) v Německu, kteří v nízkointenzivním sadu detekovali vysoké procento (72,6 %) stromů infikovaných fytoplazmou proliferace jabloně ve srovnání se sadem ve vysokointenzivním systému pěstování. Autoři připsali rozdíly rozdílné aplikaci insekticidů v porovnávaných sadech. Dá se předpokládat, že i na lokalitách pozorovaných v České republice je situace obdobná, i když v případě sledovaného ekologického sadu je výskyt fytoplazmy proliferace jabloně ovlivněn i výrazně vyšším stářím výsadby. Se zvyšujícím se počtem nízkointenzivních sadů v okrajových pěstitelských oblastech jabloní a sadů s organickou produkcí lze očekávat změny ve výskytu fytoplazmy proliferace jabloně v České republice (Fialová a kol., 2003). Získané údaje o výskytu fytoplazmy proliferace jabloně v intenzivním a ekologickém sadu tuto domněnku potvrzují, zejména z důvodu delšího výskytu vektora, mery *Cacopsylla picta*, v sadu (Opatíková, 2016; Šafářová a kol., 2016b).

Analýzou genetické variability 16S-23S rDNA bylo zjištěno, že izoláty fytoplazmy proliferace jabloně detekované v České republice nejčastěji přísluší k profilu P-I, méně se vyskytoval profil P-II, stejně jako směsné infekce. Výsledky se shodovaly s *HpaII*/RFLP analýzou izolátů fytoplazmy proliferace jabloně z České republiky (Fránová a kol., 2013). Směsná infekce byla již dříve zaznamenána nejen v České republice (Fránová a kol., 2013), ale také v Maďarsku (Paltrinieri a kol., 2010).

Na základě variability dalších genů náleželo šest detekovaných izolátů do podskupiny rpX-A, genotypů AP15 a AT-2, a tři izoláty do podskupiny rpX-B, genotypu AT-1. Zjištěná variabilita odpovídala dřívější studii provedené v České republice (Fránová a kol., 2013). Pozorování ukazují sporadický výskyt podtypu AT-1 na Moravě, i když nepotvrzují jeho

vyrazně častější nález, který byl předpokládán Fránovou a kol. (2013) v souvislosti s tím, že se jedná o oblast s průměrnou vyšší teplotou.

Molekulární analýzy genu pro HflB proteasu ATP00464 kmenů fytoplazmy proliferace jabloně odhalily sekvenční polymorfismy v rámci tohoto taxonu (Schneider a Seemüller, 2009), značná sekvenční variabilita byla zaznamenána i v této práci. Bylo publikováno, že ve fragmentech genu pro HflB proteasu jsou konkrétní motivy, které souvisejí s příznakovostí fytoplazmy proliferace jabloně a na základě nich se dají rozdělit izoláty na slabě a silně virulentní, případně latentní infekce (Seemüller a kol., 2011). Na základě těchto motivů bylo zjištěno, že pět izolátů nese motiv typický pro silně virulentní izoláty a čtyři nesou motiv typický pro slabě virulentní izoláty. Přítomnost motivů nebyla v souladu s pozorovanými symptomy, jelikož izolát 4390, který vykazoval příznaky, nesl motiv typický pro slabě virulentní izoláty. Izoláty 4405, 4406, 4436, 4460 nesou motiv typický pro silně virulentní izoláty příznaky nevykazovaly. V ekologickém sadu v důsledku velmi silného prořezávání a také s ohledem na stáří sadu nemusí být příznaky patrné, kdežto v intenzivním sadu by měly být příznaky viditelné. Je možné, že tyto motivy nejsou tak spolehlivé pro rozdělení izolátů na slabě a silně virulentní. Je třeba věnovat větší pozornost této problematice a dále studovat více izolátů.

7 Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem se věnovala molekulárně-genetické charakterizaci fytoplazmy proliferace jabloně, o které jsem vypracovala literární rešerši, ve které jsem shrnula současné poznatky o biologii a genetické variabilitě tohoto patogena. V experimentální části jsem analyzovala vybraný soubor jabloní (r. *Malus*) s cílem vyhodnotit výskyt fytoplazmy proliferace jabloně, zjistit frekvenci výskytu latentních infekcí a popsat genetickou variabilitu získaných izolátů fytoplazmy proliferace jabloně.

- Porovnála jsem výskyt fytoplazmy proliferace jabloně ve dvou sadech, které byly udržovány v odlišných systémech pěstování. V souboru 102 testovaných stromů, 50 původem z ekologického a 52 z intenzivního sadu, jsem detekovala přítomnost fytoplazmy fytoplazma proliferace jabloně, '*Candidatus* Phytoplasma mali' (skupina 16SrX-A) u dvanácti z nich. Deset jabloní nevykazovalo příznaky napadení fytoplazmou, dvě jabloně vykazovaly příznaky, přičemž u izolátu 4390 byly pozorovány příznaky mírné proliferace a izolát 4429 vykazoval atypické příznaky, bylo pozorováno červenání listů.
- Výskyt napadených stromů byl nižší v sadu v intenzivním způsobu pěstování. V intenzivním sadu bylo detekováno 5,8 % případů a v ekologickém sadu 18 % případů. Rozdíly mohou být způsobeny rozdílnou aplikací insekticidů v porovnávaných sadech, v případě ekologického sadu je výskyt fytoplazmy proliferace jabloně ovlivněn i výrazně vyšším stářím výsadby.
- Analýzou genetické variability izolátů fytoplazmy proliferace jabloně jsem potvrdila konzervativnost genu pro 16S rRNA, všechny izoláty vykazovaly 99% identitu s 16S rDNA sekvencemi fytoplazmy proliferace jabloně dostupnými v databázi GenBank.
- Genotypizací izolátů fytoplazmy proliferace jabloně bylo zjištěno převládání profilu A+1 genu pro 16S-23S rRNA a profilu A genu pro ribosomální proteiny rpl22-rps3.
- Vyšší variabilita byla detekována v případě genu pro nitroreductase-like protein, kdy byly zaznamenány izoláty genotypů AT-1, AT-2 a AP15.
- Směsné infekce, přítomnost obou dvou profilů P-I a P-II ve vzorku, byly detekovány u izolátu 4436 pocházejícího z intenzivního sadu a u izolátů 4389 a 4400 pocházejících z ekologického sadu. Směsná infekce byla detekována rovněž u izolátu 4405 pocházejícího z ekologického sadu, kdy byla zjištěna přítomnost dvou genotypů AP15 a AT-2 ve vzorku.
- Fylogenetická analýza genu pro HflB proteasu potvrdila vysokou variabilitu studovaných izolátů fytoplazmy proliferace jabloně.

- U izolátů 4405, 4406, 4429, 4436, 4460 byl detekován motiv typický pro silně virulentní izoláty a u izolátů 4389, 4390, 4396, 4400 byl detekován motiv typický pro slabě virulentní izoláty. Přítomnost motivů nebyla v souladu s pozorovanými symptomy, jelikož izolát 4390, který vykazoval příznaky, nesl motiv typický pro slabě virulentní izoláty. Izoláty 4405, 4406, 4436, 4460 nesoucí motiv typický pro silně virulentní izoláty příznaky nevykazovaly.

8 Seznam použitých zkratek

AP	Apple Proliferation Phytoplasma (fytoplazma proliferace jabloně)
CABI	Centre for Agriculture and Biosciences International
IRPCM	International Research Programme on Comparative Mycopathology
MLOs	mycoplasma-like organisms (organismy podobné mykoplazmatům)
SSCP	single strand conformation polymorphism (polymorfismus konformace jednovláknové DNA)
TAE	Tris acetate EDTA buffer (Tris-acetátový EDTA pufr)
TBE	Tris borate EDTA buffer (Tris-borátový EDTA pufr)

9 Seznam použité literatury

- Ahrens U., Seemüller E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828–32.
- Arashida, R., Kakizawa, S., Hoshi, A., Ishii, Y., Jung, H. Y., Kagiwada, S., Yamaji Y., Oshima K., Namba, S. (2008): Heterogeneous dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. *DNA and cell biology* 27(4): 209-217.
- Avinent L., Llacer G. (1995): Detection of phytoplasmas in fruit trees by polymerase chain reaction (PCR) in Spain. *Acta Horticulturae* 386: 480-483.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Radek A. J., Shevchenko D. V., Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188(10): 3682-3696.
- Baric S., Kerschbamer C., Dalla Via J. (2007): Detection of latent apple proliferation infection in two differently aged apple orchards in South Tyrol (northern Italy). *Bulletin of Insectology* 60(2): 265-266.
- Baric S., Kerschbamer C., Vigl J., Dalla Via J. (2008). Translocation of apple proliferation phytoplasma via natural root grafts - a case study. *European Journal of Plant Pathology* 121(2): 207-211.
- Baric, S., Kerschbamer, C., Wolf, M., Dalla Via, J. (2003). Latenter Apfeltriebsuchtbefall in einer Erwerbsanlage. *Obstbau Weinbau* 40: 302-303.
- Ben Khalifa M., Fakhfakh H. (2011). Detection of 16S rDNA of '*Candidatus* Phytoplasma mali' in plum decline in Tunisia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33(3): 332-336.
- Berg M., Davies D. L., Clark M. F., Vetten H. J., Maie G., Marcone C., Seemüller, E. (1999). Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145(8): 1937-1943.
- Bertaccini A., Martini M., Paltrinieri S., Brighetti M., Davies D., Fialová R., Navrátil M., Karešová R., Fránová J. (2001): A molecular survey to identify phytoplasmas associated with apple trees showing different disease symptoms. *Acta Horticulturae* 550: 371-376.
- Bertaccini A., Paltrinieri S., Martini M., Fisichella M., Ermacora P., Fontanari M. (2008). Comparison of different detection systems for apple proliferation phytoplasmas in Trentino (North Italy). *Acta Horticulturae* 781: 453–458.
- Blatný C., Jr., Seidl V., Erbenová M. (1963). The apple proliferation of various sorts and possible strain differentiation of viruses. *Proceedings 5th European Symposium on Fruit Tree Virus Diseases. Phytopathologia Mediterranea* 2: 119–123

- Blažek J., Vávra R., Kučerová J. (2005). Analysis concerning the rapid spread of apple proliferation phytoplasmas in a breeding orchard of apple seedlings. *Horticultural Science* 32(2): 43-49.
- Bliefernicht K., Krczal, G. (1995). Epidemiological studies on apple proliferation disease in Southern Germany. *Acta Horticulturae* 386: 444-447.
- Blystad D.R., Toppe B., Holst M. A., Brurberg M. B. (2012). Survey for apple proliferation in orchards close to nurseries in Norway in 2011. Abstract book 22nd International Conference on Virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Rome June 3-8: 98.
- Bonas U. (1994). Hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Current Topics of Microbiological Immunology* 192: 79-98.
- Bovey, R. (1963) Apple proliferation. In: *Virus diseases of apples and pears*. Technical Communication, Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops No. 30, pp. 63-67.
- Brzin J., Ermacora P., Osler R., Loi N., Ravnikar M., Petrovič, N. (2003). Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110(5): 476-483.
- CABI. 2009. Crop protection compendium: global module. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK. <http://www.cabi.org/compendia/cpc/>.
- CABI. 2011, Crop Protection Compendium: *Phytoplasma australiense* (Australian grapevine yellows). Wallingford, UK: CAB International. Citováno: 30. listopadu, 2015 z <http://www.cabi.org/cpc/?compid=1&dsid=39956&loadmodule=data>.
- Cainelli, C., Bisognin, C., Vindimian, M. E., Grando, M. S. (2004). Genetic variability of AP phytoplasmas detected in the apple growing area of Trentino (North Italy). *Acta Horticulturae* 657: 425-430.
- Canik D., Ertunc F. (2007). Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. *Bulletin of Insectology* 60(2): 335.
- Card, S. D., Pearson M. N., Clover G. R. G. (2007). Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology* 36: 455–461.
- Carraro L., Ermacora P., Loi N., Osler R. (2004). The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees. *Journal of Plant Pathology* 86(2): 141-146.
- Carraro L., Loi N., Ermacora P. (2001). Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107 (7): 695-700.
- Casati P., Quaglino F., Tedeschi R., Spiga F. M., Alma A., Spadone P., Bianco P. A. (2010). Identification and molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ isolates in North-western Italy. *Journal of Phytopathology* 158(2): 81-87.

- Casati P., Stern A., Spadone P., Calvi M., Bulgari D., Bianco P. A., Belli G. (2007). Molecular diversity in '*Candidatus Phytoplasma mali*' in Lombardia. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 359-360.
- Ciccotti A. M., Bisognin C., Battocletti I., Salvadori A., Herdemertens M., Jarausch W. (2008). Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes. *Agronomy Research*, 6(2): 445-458.
- Cieślińska M., Kruczyńska D., Jaworska K. (2012). Detection and characterization of phytoplasmas infecting apple trees in Poland and identification of their possible vectors. *Petria*, 22: 185.
- Cieślińska M., Morgaś H. (2011). Detection and identification of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', '*Candidatus Phytoplasma mali*' and '*Candidatus Phytoplasma pyri*' in stone fruit trees in Poland. *Journal of phytopathology* 159(4): 217-222.
- Cordova I., Jones P., Harrison N. A., Oropeza C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology*, 4(2): 99-108.
- Davies, D. L., Stickels, J. E., Adams, A. N. (1986). A single occurrence of apple proliferation in England. *Plant Pathology* 35(3): 400-402.
- Davis R. E, Lee I. M. (1993). Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 1008-1011.
- Davis R. E., Jomantiene R., Kalvelyte A., Dally, E. L. (2003). Differential amplification of sequence heterogeneous ribosomal RNA genes and classification of the '*Fragaria multicipita*' phytoplasma. *Microbiological research* 158(3): 229-236.
- Del Serrone P., La Starza S., Krystai L., Kolber M., Barba M. (1998). Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *Journal of Plant Pathology*, 53-58.
- Delic D., Martini M., Ermacora P., Myrta A., Carraro, L. (2007). Identification of fruit tree phytoplasmas and their vectors in Bosnia and Herzegovina. *EPPO bulletin* 37(2): 444-448.
- Deng S. J., C. Hiruki (1991a). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable 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. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- Dudek, B., Paltrinieri, S., Ivanovic, M., Bertaccini, A. (2008). Phytoplasmas infecting fruit trees in Serbia. *Acta Horticulturae* 781: 351-358.
- EPPO/CABI (1997). *Quarantine Pests for Europe*. 2nd edition. Edited by Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M. CABI, Wallingford, UK, 1425 pp.

- Fialová, R., Navrátil, M., Válová, P. (2003). Phytoplasma occurrence in apple trees in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 39: 7–12.
- Firrao G., Garcia-Chapa M., Marzachi C. (2007). Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers Bioscience* 12: 1352–1375.
- Fránová, J., Ludvíková, H., Paprštejn, F., Bertaccini, A. (2013). Genetic diversity of Czech ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’ strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology* 136(4): 675–688.
- Fránová, J., Petrzik, K., Růžičková, M., Paprštejn, F., Kučerová, J. (2008). Molecular identification of phytoplasmas in cultivar collection and production plantations of apple and pear trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* 781: 359–368.
- Frisinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M. S., Forti, D., Vidimian, M. E. (2000). *Cacopsylla costalis* (Flor 1861) as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology* 148: 425–431.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M. A., Lavina, A., Batlle, A. (2003). Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant pathology* 52(4): 513–520.
- Gibb K. S., Padovan A. C., Mogen B. D. (1995) Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species in northern Australia. *Phytopathology* 85(2): 169–174.
- Giunchedi, L., Pollini, C. P. (2003). Malattie da virus, viroidi e fitoplasmi degli alberi da frutto. *Edagricole*.
- Glass, J. I., Lefkowitz, E. J., Glass, J. S., Heiner, C. R., Chen, E. Y., Cassell, G. H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 407(6805): 757–762.
- Gundersen D. E, Lee I. M., Rehner S. A., Davis R. E., Kingsbury D. T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176: 5244–5254.
- Heintz, W. (1986). *Cuscuta odorata* – an effective vector for mycoplasma-like organisms (MLO). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 38: 138–141.
- Chireceanu C., Cieślińska M. (2014): Molecular characterization of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma pyri’ strains from Romania, pp. 122–129. In: Bertaccini A. (ed.) *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*. COST, Bologna, Italy.
- International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes* (1993). Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 394–397.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that

- colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.
- Ito, K., Akiyama, Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annual Review of Microbiology* 59: 211-231.
- Jarausch W., Saillard C., Helliott B., Garnier M., Dosba F. (2000): Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes* 14: 17-24.
- Jarausch W.; Peccerella, T.; Schwind, N.; Jarausch, B.; Krczal, G. (2004b). Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657: 415-420.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Dickler, E., Seemüller, E. (2003). First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Disease* 87(1): 101-101.
- Jarausch, B.; Schwind, N.; Jarausch, W.; Krczal, G. (2004a). Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation phytoplasmas. *Acta Horticulturae* 657, 409-413.
- Jarausch, W., Bisognin, C., Peccerella, T., Schneider, B., Seemüller, E. (2008). Development of resistant rootstocks for the control of apple proliferation disease. *Acta horticulturae* 781: 381-386.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bové, J. M. (1994). Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8): 2916-2923.
- Jomantiene, R., Davis, R. E. (2005). Apple sessile leaf: a new disease associated with a 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' subgroup 16SrI-B phytoplasma in Lithuania. *Plant Pathology* 54(2): 237-237.
- Jung, H. Y., Miyata, S. I., Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Namba, S. (2003). First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasma genome. *DNA and cell biology* 22(3): 209-215.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Sawayanagi, T., Namba, S. (2001). Cloning and expression analysis of *Phytoplasma* protein translocation genes. *Molecular plant-microbe interactions* 14(9): 1043-1050.
- Kamińska, M., Śliwa, H. (2008a). First report of 'Candidatus *Phytoplasma mali*' in oriental lilies and its association with leaf scorch in Poland. *Plant Pathology* 57(2): 363.
- Kamińska, M., Śliwa, H. (2008b). Mixed infection of dahlia plants in Poland with apple proliferation and aster yellows phytoplasmas. *Plant Pathology* 57(2): 363.
- 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.
- Kartte, S.; Seemüller, E. (1988). Variable response within the genus *Malus* to the apple proliferation disease. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 95: 25-34.
- Khan A.J., S. Botti, S. Paltrinieri, A.M. Al-Subhi and A. Bertaccini (2002). Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: 14th International Organization of Mycoplasma Conference, July 07–12, 2002, Vienna, Austria, 6.
- Krczal, G.; Krczal, H.; Kunze, L. (1989): *Fiebertiella florii* (Stal), a vector of apple proliferation agent. *Acta Horticulturae* 235: 99-106.
- Križanac I., Mikec I., Budinščak Ž., Šeruga Musić M., Škorić D. (2010): Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(5): 206–213.
- Kube M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt R., Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics* 9(1): 306.
- Kube M., Schneider, B., Reinhardt, R., Seemüller, E. (2007). First look into the genome sequence of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in comparison to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-MB. *Bulletin of Insectology* 60: 113-114.
- Kučerová J., Karešová R., Erbenová M., Vacková H. (2005). First results from monitoring dynamic of occurrence apple proliferation (AP) during vegetation season. *Vědecké práce ovocnářské*, 19: 97–103.
- Kunze L. (1976). The effect of different strains of apple proliferation on the growth and crop of infected trees. *Mitt. Biol. Bundesanst. LandForstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 170: 107-115.
- Kunze L. (1989). Apple proliferation, pp. 99-113. In: *Virus and virus-like diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders* (Fridlund P. R., Ed.). Washington State University.
- Lee I. M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gunderson, D. E. (1995). Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.
- Lee I. M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Davis, R. E., Harrison, N. A. (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.E., Chen T. A., Chiykowski L. N., Fletcher J., Hiruki C., Schaff D. A. (1992). A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82: 977–986.

- Lee I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221–255.
- Lee I. M., Gundersen D., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C. , Seemüller E. (2004a). '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology* 54: 1037–1048.
- Lee I. M., Gundersen D., Hammond R.W., Davis R.E. (1994). Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559–566.
- Lee I. M., 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 sequences. *International journal of systematic bacteriology* 48: 1153–1169.
- Lee I. M., Hammond, R. W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993b). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834–842.
- Lee I. M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 337–347.
- Lee I. M., Zhao, Y., Bottner, K. D. (2006). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20: 87–91.
- Lemmetty A., Soukainen M., Tuovinen T. (2013). First report of '*Candidatus* Phytoplasma mali', the causal agent of apple proliferation disease, in apple trees in Finland. *Plant Disease* 97(10):1376.
- Liefting, L. W., Andersen, M. T., Beever, R. E., Gardner, R. C., Forster, R. L. (1996). Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3133-3139.
- Lim, P. O., Sears, B. B. (1991). DNA sequence of the ribosomal protein genes rp12 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS microbiology letters* 84(1): 71-73.
- Loi, N., Carraro, L., Mussetti, R., Ferraro, G., Osler, R. (1995). Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. *Journal of Phytopathology* 143(10): 581-584.
- 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.
- Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E. (1999b). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.

- Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. (1996b). Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant Pathology* 45: 857-863.
- Martini M., Ermacora P., Falginella L., Loi N., Carraro L. (2008): Molecular differentiation of '*Candidatus* Phytoplasma mali' and its spreading in Friuli Venezia Giulia region (north-east Italy). *Acta Horticulturae* 781: 395-402.
- Martini M., Lee I.-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan A.J., Osler R. (2007a). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2037-2051.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P. A., Bertaccini, A. (2002). Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular probes* 16(3): 197-208.
- Marwitz, R., Petzold, H., Ozel, M. (1974). Studies on the transfer of the possible causal agent of apple proliferation to a herbaceous host [*Vinca rosea*, *Cuscuta subinclusa*, mycoplasma-like organisms]. *Phytopathol. Z.* 81: 85-91.
- Marzachi, C., Milne, R. G., Bosco, D., Pandalai, S. G. (2004). Phytoplasma-plant-vector relationships. *Recent research developments in plant pathology* 3: 211-241.
- Maszkiewicz J., Blaszczyk W., Millikan D. F. (1980). Changes in phloridzin content, osmotic values of cellular sap, and cell wall thickness of apple leaf tissue associated with the proliferation disease. *Phytopathologische Zeitschrift* 99(1): 33-36.
- Mattedi, L., Forno, F., Cainelli, C., Grando, M. S., Jarausch, W. (2008): Research on '*Candidatus* Phytoplasma mali' transmission by insect vectors in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 369-374.
- Matus, J. T., Vega, A., Loyola, R., Serrano, C., Cabrera, S., Arce-Johnson, P. (2008). Phytoplasma and virus detection in commercial plantings of *Vitis vinifera* cv. Merlot exhibiting premature berry dehydration. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(5): 7-8.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovič, N., Gruden, K., Dreo, T., Žežlina, I., Seljak, G., Ravnikar, M. (2007): First report of '*Candidatus* Phytoplasma mali' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant Pathology* 56(4): 721.
- Mehle, N., Turk, B. A., Brzin, J., Nikolič, P., Dermastia, M., Boben, J., Ravnikar, M. (2010). Diagnostics of fruit trees phytoplasmas – the importance of latent infections. *Julius-Kühn-Archiv* (427): 412.
- Mitrović, J., Kakizawa, S., Duduk, 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(1): 41-48.
- Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C. W., Madlen, L. V., Miller, S. A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows

- phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 89: 1223-1232.
- Musetti, R., di Toppi, L. S., Ermacora, P., Favali, M. A. (2004). Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94(2): 203-208.
- Myrta, A., Ermacora, P., Stamo, B., Osler, R. (2003). First report of phytoplasma infections in fruit trees and grapevine in Albania. *Journal of Plant Pathology* 85(1): 64.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., Tsuchizaki, T. (1993b). Detection and differentiation of plantpathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 786–791.
- Navrátil M., Karešová R. (1998): Apple proliferation phytoplasma [Proliferace jabloně]. *Ochrana rostlin*, 34(1): supplement.
- Navrátil M., Příbylová J., Válová P., Fialová R., Šafařová D., Špak J., Kubelková D., Petrzik K., Karešová R., Špaková V. (2007): Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*. *Bulletin of Insectology* 60: 123-124.
- Neimark, H., Kirkpatrick, B. C. (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Molecular microbiology* 7(1): 21-28.
- Németh M. (1986). *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Lancaster, Boston, USA/Dordrecht, Netherlands: M. Nijhoff Publishers, 841 pp.
- OEPP/EPPO (2011). EPPO Standard PM 5/3(5). Decision-support scheme for quarantine pests from <http://www.eppo.org/quarantine/quarantine.htm>.
- OEPP/EPPO (2015). EPPO Alert List from: <http://www.eppo.org/quarantine/quarantine.htm>
- Olivier T., Fauche F., Demonty E. (2014). Distribution of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in infected apple trees in Belgium. *Commun Agric Appl Biol Sci* 79(3): 463-7.
- Opatíková M. (2016). Fytoplazma proliferace jabloně ('*Candidatus Phytoplasma mali*') - molekulárně-genetická charakteristika fytoplazmy a její vektorů. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- 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(1): 27-29.
- Padovan A. C., Gibb K. S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R. E., Magarey P. A., Sears B. B. (1995). Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 25–31.
- Paltrinieri S., Duduk B., Dal Molin F., Mori N., Comerlati G., Bertaccini A. (2010): Molecular characterization of '*Candidatus Phytoplasma mali*' strains in outbreaks

- of apple proliferation in north eastern Italy, Hungary, and Serbia. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 178-182.
- Pedrazzoli, Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Salvadori, A., Zorer, R. (2008a). Seasonal colonization behavior of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in apple trees in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 483-488.
- Pedrazzoli, F., Gualandri, V., Forno, F., Mattedi, L., Malagnini, V., Salvadori, A., Stoppa G., Ioriatti, C. (2007). Acquisition capacities of the overwintering adults of the psyllid vectors of '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *Bulletin of insectology* 60(2): 195-196.
- Rui, D., Ciferri, R., Refatti, E. (1950): La virosi degli scopazzi del melo nel veronese. *Notiziario delle malattie delle piante* 13: 7-11.
- Rumbou A., Carraro L., Nanos G., Boutla I., Rumbos L. C. (2008). First report of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in Greece and correlation with small apple fruit disorder occurring in the orchards of Pelion mountain. *Acta Horticulturae* 781: 505-509.
- Saeed, S. T., Srivastava, A. K., Saroj, A., Khan, A., Samad, A. (2016). Phylogenetic analysis of 'rose witches'-broom' phytoplasma from cultivated *Rosa damascena* in India representing a new subgroup V-B1 in 16S rRNA gene group V. *Plant Gene* 5: 71-77.
- Seemüller E. (2002). Apple proliferation: etiology, epidemiology and detection. In: Brunelli A., Canova A. (eds.). In: *Proceedings Giornate Fitopatologiche*, Vol. I, Basalga di Piné (Trento) 2002, 3-6.
- Seemüller E., Kampmann M., Kiss E., Schneider B. (2011): HflB gene-based phytopathogenic classification of '*Candidatus Phytoplasma mali*' strains and evidence that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(10): 1258-1266.
- Seemüller E., Kison H., Lorenz K. H. (1998a). On the geographic distribution and prevalence of the apple proliferation phytoplasma in lowintensity orchards in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 404-410.
- Seemüller E., Kunze L., Schaper U. (1984b). Colonization behaviour of MLO, and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. *Journal of Plant Disease and Protection* 91: 525-532.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. (1998b). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.
- Seemüller E., Schaper U., Zimbelmann F. (1984a) Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 371-382.
- Seemüller, E. (1990). Apple proliferation. In: *Compendium of apple and pear diseases*, pp. 67-68. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Seemüller, E., Kampmann, M., Kiss, E., Schneider, B. (2011). HflB gene-based phytopathogenic classification of '*Candidatus phytoplasma mali*' strains and evidence

- that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. *Molecular plant-microbe interactions* 24(10): 1258-1266.
- Seemüller, E., Kiss, E., Sule, S., Schneider, B. (2010). Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. *Phytopathology* 100: 863-870.
- Seemüller, E., Moll, E., Schneider, B. (2007). *Malus sieboldii*-based rootstocks mediate apple proliferation resistance to grafted trees. *Bulletin of Insectology* 60(2): 301.
- Seemüller, E., Schneider, B. (2004). '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4): 1217-1226.
- Seemüller, E., Schneider, B. (2007). Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964-970.
- Schaper, U., Seemüller, E. (1982): Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72: 736-742.
- Schaper, U., Seemüller, E. (1984): Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 91: 608-613.
- 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. *Journal of general microbiology* 139:519-527.
- Schneider B., Marcone C., Kampmann M., Ragozzino A., Lederer W., Cousin M. T., Seemüller E. (1997). Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 675–686.
- Schneider B., Seemüller E. (1994). Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3409-3412.
- Schneider B., Seemüller E. (2009): Strain differentiation of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by SSCP- and sequence analyses of the HflB gene. *Journal of Plant Pathology* 91(1): 103-112.
- Schneider B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* 1: 369-380.
- Smart C. D., Schneider B., Blomquist C. L., Guerra L. J., Harrison N. A., Ahrens U., Lorenz K. H., Seemüller E., Kirkpatrick B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers

- based on sequences of the 16S–23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988–93.
- Smith I. M., Dunez J., Lelliott R. A., Phillips D. H., Archer S. A (1988). *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Scientific Publications, U.K.
- Strauss, E. (2009). Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325(5939): 388-390.
- Šafářová D., Starý M., Válová P., Opatíková M., Bílková L., Návrátil M. (2016b). Phytoplasma infection risk in apple orchards. *Horticultural Science* (v tisku).
- Šafářová D., Zemánek T., Válová P., Navrátil M. (2016a). 'Candidatus Phytoplasma cirsii', a novel taxon from Creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Publikováno online: 05/02/2016.
- Tamas, I., Klasson, L., Canbäck, B., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Wernegreen, J. J., Andersson, S. G. (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296(5577): 2376-2379.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tedeschi, R., Alma, A. (2004). Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 97(1): 8-13.
- Tedeschi, R., Alma, A. (2006). *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Plant disease* 90(3): 284-290.
- Tedeschi, R., Lauterer, P., Brusetti, L., Tota, F., Alma, A. (2009). Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European journal of plant pathology* 123(3): 301-310.
- Toth, K. F., Harrison, N., Sears, B. B. (1994). Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *International journal of systematic bacteriology* 44: 119–124.
- Tran-Nguyen, L. T. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K. S. (2008). Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190(11): 3979-3991.
- Unterthurner M., Baric S. (2011). Apfeltriebsucht: Sechs Jahre Erfahrungen in einer Modellanlage. *Obstbau Weinbau* 48: 77–78.
- Vindimian, M. E., Ciccotti, A., Filippi, M., Springhetti, M., and Deromedi, M. (2002). Spread of apple proliferation by root bridges. *Petria* 12: 375.
- Wernegreen, J. J. (2002) Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* (3): 850–861.

Zawadzka B. J. (1976). Reaction of apple cultivars to infection by apple proliferation disease.
Acta Horticulturae 67: 113-120.