

Diagnostika významných virů jabloní

Autoreferát doktorské disertační práce

Ing. Lucie Winkowska

Praha 2016

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita
v Praze
Kamýcká 129
165 21, Praha 6 - Suchbátka

www.af.czu.cz



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Ing. Lucie Winkowska

.....
Katedra ochrany rostlin

Diagnostika významných virů jableň

Diagnosis of the important apple viruses

.....
Autoreferát doktorské disertační práce

Studijní program: Zemědělská specializace (P4106)

Studijní obor: Zemědělská a lesnická fytopatologie a ochrana rostlin (4102V011)

Školitel: **Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.**

Katedra ochrany rostlin

Konzultant: **Ing. Lenka Grimová, Ph.D.**

Katedra ochrany rostlin

Oponenti: **Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava**

VÚRV Praha-Ruzyně

Ing. Petr Svoboda, CSc.

ChI Žatec

Ing. Jana Fránová, Ph.D.

BC AV České Budějovice

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne v hod. na
Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze.

S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU v Praze.

Praha 2016

Summary

Apple mosaic virus (ApMV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) are economically the most important viruses in pome fruit trees, which are distributed worldwide and can cause significantly yield reduction. The major control strategies (namely pathogen detection, exclusion by crop certification or quarantine, control in infected orchards by eradication from infected cultivars and rootstocks, etc.) rely heavily on accurate and sensitive detection methods and on perfect knowledge of pathogens.

In the doctoral thesis the diagnostic method quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was optimized for detection and quantification of four studied viruses. The results suggested that qRT-PCR method was the most reliable technique in comparison with conventional diagnostic methods DAS/I-ELISA and RT-PCR.

In our study the concentration of ASGV, ASPV and ACLSV, measured by qRT-PCR, were stable during vegetation and in different plant tissue. Only the concentration of ApMV changed during vegetation in leaves and inner bark. This result indicates that changes of virus concentration observed by DAS/I-ELISA and RT-PCR in plant tissues are caused by other way (inhibitors, plant senescence, lower sensitivity, ect.) than by changes of virus concentrations in plant.

Under the monitoring (at all 427 trees were tested) it was showed, that studied viruses were more spread in orchards and gardens than in wild apple trees.

Selected virus isolates from wild apple trees and apples from orchards and gardens were sequenced and molecular variability was studied also with already published isolates. However individual isolates of studied viruses were similar. The variability associated with geographic origin or with type of planting has not been confirmed.

Obsah

1.	Přehled o současném stavu poznání	4
2.	Vědecké hypotézy a cíle práce	6
3.	Materiál a metody	7
4.	Výsledky a diskuze	9
5.	Závěry a doporučení.....	11
6.	Seznam publikací	12
7.	Literatura.....	13

1. Přehled o současném stavu poznání

Virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV), virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) a virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) jsou celosvětově rozšíření patogeni (Fulton, 1972), kteří způsobují značné ekonomické ztráty na jabloních (Mink, 1989). Infekce uvedenými viry je ve většině případů latentní, na napadených rostlinách se neobjevují žádné příznaky, ale může dojít k významnému snížení výnosů (Neméth, 1986). U směsných infekcí se ztráty při pěstování jabloní na našem území pohybují okolo 40 % (Svoboda a Polák, 2010), což potvrzují i zahraniční studie, kde jsou uváděny hodnoty snížení výnosu u pěstovaných dřevin až 60 % (Menzel *et al.*, 2002). Rozšíření těchto virů v sadech jaderovin na území ČR je značné. Uvádí se, že zhruba 50 % pěstovaných jabloní a 20 % hrušní je infikováno uvedenými viry (Svoboda a Polák, 2010). Pokud se symptomy u některého z virů objeví, jsou velice variabilní (EPPO, 1991).

Přenos výše uvedených virů probíhá vegetativním množením nebo mechanicky (Neméth, 1986). U žádného z nich není znám vektor, který by jej přenášel (Fulton, 1972). Nebyl potvrzen ani přenos virů mezi jabloněmi pylem nebo semeny (Neméth, 1986). Ochranou před těmito viry je především prevence. Pokud je už rostlina virem napadena, není možné ji vyléčit. Využití zdravého množitelského materiálu, jak při vegetativním tak generativním množení rostlin, by proto mělo být samozřejmostí (EPPO, 1999).

Hostitelský okruh ApMV je velice široký a zahrnuje bylinné i dřevinné hostitele. Mezi hostitelské rostliny využívané v ovocnářství patří jabloně (*Malus domestica*), hrušně (*Pyrus communis*), slivoně (*Prunus domestica*), broskvoně (*Prunus persica*), meruňky (*Prunus armeniaca*), třešně a višně (*Prunus avium*), mandloně (*Prunus amygdalus*), lísky (*Corylus avellana*), jahodníky (*Fragaria* sp.), maliníky (*Rubus idaeus*), ostružiníky (*Rubus occidentalis*) a rybíz (*Ribes rubrum*) (Crop protection compedium, 2003). ACLSV napadá také široké spektrum rostlin, z ovocných dřevin se jedná o jaderoviny (*Malus* sp. a *Pyrus* sp.) a peckoviny (*Prunus domestica*, *P. persica*, *P. armeniaca*, *P. avium*) (Neméth, 1986). ASPV a ASGV byly zatím popsány především na jaderovinách

(*Malus* sp. a *Pyrus* sp.) (Neméth, 1986). ASPV byl však detekován i na kdouloni (*Cydonia oblonga*) (Mathioudakis *et al.*, 2006) a přítomnost ASGV byla popsána také na broskvoni (*P. persiaca*) (Takahashi *et al.*, 1990).

Diagnostika těchto virů nemůže být prováděna na základě symptomatiky, protože jak již bylo uvedeno výše, příznaky jsou velice variabilní a většinou nejsou vůbec patrné (Astier *et al.*, 2007). Biologická metoda indikátorových rostlin a elektronová mikroskopie nemohou být využity při rutinní diagnostice pro svoji časovou náročnost. Jedná se spíše o metody pro vědecké účely (Waller *et al.*, 2002). V současnosti se mezi běžně používané diagnostické metody řadí imunochemické a molekulární metody (Menzel *et al.*, 2002). Komplikací při diagnostice je však nízká koncentrace virů v rostlině (Matic *et al.*, 2008). Další problém, který se při využití těchto metod objevuje, je jejich proměnlivá spolehlivost v průběhu vegetační doby. To může být způsobeno skutečným kolísáním množství virů v různých částech rostliny během roku (Lee *et al.*, 2002) anebo přítomností látek inhibujících použité diagnostické metody, které rostliny během vegetace produkují v odlišném množství (Thokchom *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu se v současnosti u mnoha virových chorob (virus zakrslosti slivoně, virus nekrotické kroužkovitosti slivoně) rozvíjí diagnostika a kvantifikace patogena pomocí kvantitativní PCR, což umožňuje určit kolísání množství viru v rostlině (Jarošová a Kundu, 2010; Marbot *et al.*, 2003).

2. Vědecké hypotézy a cíle práce

Hlavní vědeckou hypotézou předkládané práce byl předpoklad, že distribuce viru mozaiky jabloně, viru žlábkovitosti kmene jabloně, viru vrásčitosti kmene jabloně a viru chlorotické skvrnitosti listů jabloně se v různých rostlinných orgánech jabloní liší a zároveň dochází i k fluktuaci titru virů v rostlinách v průběhu celého roku.

Dílní hypotézou byl předpoklad, že hostitelské spektrum sledovaných virů je podstatně širší, než se do dnešní doby předpokládalo, avšak jejich množství v těchto rostlinách je natolik nízké, že znemožňuje jejich detekci pomocí běžně používaných sérologických a molekulárně genetických technik.

Hlavním cílem práce byla detekce a kvantifikace viru mozaiky jabloně, viru žlábkovitosti kmene jabloně, viru vrásčitosti kmene jabloně a viru chlorotické skvrnitosti listů jabloně v rostlinách pomocí několika detekčních technik, jmenovitě pomocí metody kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR), dále za využití konvenční metody RT-PCR a pomocí sérologických metod DAS/DASI-ELISA.

Dalšími cíli byly:

- monitoring výskytu ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV na našem území, a to u kulturně pěstovaných i planých rostlin
- studium molekulární variability u izolátů ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV.

3. Materiál a metody

V rámci práce byla optimalizována detekční metoda real-time RT-PCR (qRT-PCR) pro čtyři vybrané viry jádrovin, jmenovitě pro virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV), virus vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) a virus chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leafspot virus*, ACLSV) pomocí *Power SYBR[®] Green RNA-to-CTTM 1-Step Kit* (Applied BiosystemsTM). Pro tuto metodu byly navrženy primery, které byly specifické pro detekci výše uvedených virů.

Následně byla optimalizovaná qRT-PCR metoda porovnávána s dalšími diagnostickými metody (RT-PCR a DAS/I-ELISA), aby se ukázalo, zda se liší ve schopnosti detekce jednotlivých patogenů (a to s přihlédnutím na různé fáze vegetace vlivem senescence rostlinných orgánů nebo v různých rostlinných orgánech, kde může být detekce ovlivněna přítomností terpenů a dalších látek). Během roku byly odebrány pupeny, květy, listy (3krát během vegetace) a lýko (4krát během vegetace) z pěti odrůd jabloní (Rubín, Bohemia, Topaz, Angold a Idared) se směsnou infekcí všemi čtyřmi viry. Sérologické testy byly prováděny komerčními protilátkami od firmy Agritest (ApMV), Bioreba (ASGV, ASPV) a Loewe (ACLSV). Celková RNA pro RT-PCR reakci byla izolována „silika“ metodou dle Rott a Jelkmann (2001). Pro detekci virů byly použity již dříve publikované primery (161Z8 a 161Z9, Petrzik, unpublished; ASGVU a ASGV2as, James, 1999; ASPCs a ASPas: Jelkmann a Keim-Konrad, 1997; ACLSVF1 a ACLSVR1, Watpade *et al.*, 2012).

Optimalizovaná metoda qRT-PCR byla aplikována také v rámci studie kvantifikace vybraných virů v rostlinách jabloní v průběhu vegetačního období. Pro tento účel byly optimalizovány standardní křivky pro absolutní kvantifikaci studovaných virů. Zároveň byla optimalizována detekce referenčního genu. Pro kvantifikaci byl použit rostlinný materiál ze tří odrůd jabloní (Rubín, Bohemia a Topaz). Vzorky (pupeny, listy, květy, lýko), pokud se na stromě vyskytovaly, byly odebrány jednou měsíčně. Vzorky jabloní byly v průběhu roku zároveň testovány sérologickými (DAS/I-ELISA) a konvenčními molekulárně genetickými technikami (RT-PCR). Za účelem stanovení relativní

koncentrace jednotlivých virů v různorodém testovaném materiálu odebíraném v různých vegetačních obdobích, byl homogenát z rostlinných pletiv na začátku jednotlivých izolačních technik vždy několikrát naředěn, čímž byla vytvořena tzv. koncentrační řada (RT-PCR: 10x, 50x, 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x; DAS/I-ELISA: 20x, 50x, 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x). Cílem pokusu bylo určit, zda dochází k podstatným výkyvům v koncentraci jednotlivých virů (obdobu metody qRT-PCR).

Zároveň v letech 2012-2016 probíhal monitoring sledovaných virů na celkem 427 rostlinách. Převážně se jednalo o jabloně (311) různého původu, dále byly do monitoringu zahrnuty kdouloně (38), mišpule (15), slivoně (12), lísky (12), hrušně (3), aronie (4), břízy (4), skalníky (4), kdoulovce (5), jírovce (5), bezy (5) a hlohy (9). Testované jabloně pocházely z kulturních výsadeb (převážně šlo o staré sady a zahrady, ale zahrnuty byly i jabloňové aleje nebo školky) a do testů byly zahrnuty i volně rostoucí stromy jabloní různého stáří. Odebrané vzorky byly testovány RT-PCR nebo qRT-PCR metodou.

Některé vzorky jabloní, u nichž byla přítomnost patogenů potvrzena, byly použity jako zdroj virových izolátů pro studium molekulární variability studovaných virů. Konkrétně byly osekvenovány geny pro obalový protein virů pomocí již dříve navržených primerů (87E5 a 87Eδ, Petrzik a Lenz, 2002; ASGV5641 a ASGV6396, Nickel *et al.*, 2001; ASPV7956 a ASPDEL, Schwarz a Jelkmann, 1998 a Komorowska *et al.*, 2010; ACLSVs a ACLSVas, Menzel *et al.*, 2002). Takto získané sekvence byly porovnávány pomocí programu BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciences, USA) mezi sebou a i s izoláty z jabloní různého geografického původu, které byly uveřejněny na NCBI. Fylogenetické analýzy byly provedeny na základě shlukové analýzy dat pomocí metody Neighbour-joining algoritmu (Saitou and Nei, 1987) za využití programu Clustal X algorithm, version 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) s bootstrap hodnotou 1000 replikací (Felsenstein, 1985).

4. Výsledky a diskuze

Z mnoha virů vyskytujících se na jabloních patří čtyři námi studované viry, jmenovitě ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV, mezi ekonomicky nejvýznamnější patogeny těchto dřevin (Desvignes, 1999). Za hlavní způsob přenosu je u zmiňovaných virů považováno vegetativní množení infikovaného rostlinného materiálu. Z tohoto důvodu je dostatek spolehlivých biologických, sérologických a molekulárních metod na detekci virových patogenů v rostlinné tkáni nezbytný (Hadidi et al., 2011). Jen na základě jejich spolehlivosti mohou být kontrolní strategie proti virovým patogenům jabloní účinné.

Z výsledků porovnání jednotlivých detekčních metod vyplývá, že nejspolehlivější metodou je metoda qRT-PCR, kterou lze použít k detekci všech čtyř virů v průběhu celého roku a na všechny rostlinné orgány bez jakýchkoli potíží. Při použití metod DAS/I-ELISA a RT-PCR dochází ke změnám detekovatelnosti virů, jak v průběhu vegetace, tak mezi různými rostlinnými orgány. Metodu DAS/I-ELISA lze uplatnit v časném jarním období, později již výsledky nejsou přesné, zvláště v případě ApMV a ASGV. Metodu RT-PCR lze pro detekci používat od jara do brzkého podzimu, avšak v případě ACLSV a ASPV neposkytuje zcela spolehlivé výsledky na jaře.

Co se týká rozdílnosti v detekovatelnosti virů mezi metodami DAS/I-ELISA a RT-PCR, jsou pozorované nuance ve shodě s již dříve publikovanými studiemi: sérologické testy jsou využitelné po kratší dobu vegetace než RT-PCR, optimálních výsledků dosahují jen s mladými listy a květy a jsou méně citlivé než RT-PCR (Torrance a Dolby, 1984; Kinard *et al.*, 1996; Desvignes, 1999; Kirby *et al.*, 2001).

Změny ve spolehlivosti detekce virů těmito dvěma metodami v průběhu vegetace nebo u různých hostitelských rostlin jsou popisovány řadou autorů, avšak je komplikované určit příčinu, zda dochází ke skutečným změnám v koncentraci virů nebo se jedná o ovlivnění spolehlivosti metod inhibitory (Svoboda a Polák, 2010; Kundu, 2003a; Arntjen a Jelkmann, 2010)

Námi získaná data z kvantitativní techniky qRT-PCR naznačují, že pozorované výkyvy koncentrace virů u sérologických metod a techniky RT-PCR nejsou způsobeny změnami v koncentraci samotných virů v rostlinách, ale že spíše dochází k ovlivnění

spolehlivosti detekčních metod, a to zřejmě přítomností inhibičních látek v testovaném materiálu, senescencí rostlinného materiálu anebo jsou používané metody ovlivněny dalšími vlivy, které nejsou zatím objasněny. Výjimku tvoří ApMV u něhož byla změna koncentrace viru během roku pozorována i metodou qRT-PCR, ale i přesto bylo možno virus touto metodou detekovat během celého roku. V případě ACLSV nebyly zaznamenány změny v koncentraci viru v průběhu vegetace, ale nejvyšší obsah viru byl metodou qRT-PCR zaznamenán v květech.

V rámci monitoringu se podařilo potvrdit výskyt virů pouze u stromů jabloní. Z 311 testovaných jabloní byla infekce alespoň jedním virem prokázána u 196 stromů (63 %). Směsné infekce byly potvrzeny ve 150 případech (48 %) a byly velice rozšířeny v sadech a zahradách. Přítomnost všech testovaných virů byla výrazně vyšší u vzorků odebraných z jabloní ze zahrad a sadů, než v případě vzorků, získaných z volně rostoucích stromů jabloní. I v předchozích studiích výskytu významných virů jabloní na našem území, se u kulturně pěstovaných jaderovin (ovocné sady), potvrdil jejich značný výskyt (Kundu, 2003b; Kundu *et al.*, 2003; Polák a Svoboda, 2006; Polák a Zieglerová, 2001; Polák *et al.*, 1997; Svoboda a Polák, 2010).

Mezi nejčastěji vyskytující se vir v sadech patřil ACLSV (79 %), stejně jako v zahradách, kde však míra jeho infekce byla stejná s ASPV (76 %). Naopak u volně rostoucích stromů jabloní se přítomnost ACLSV neprokázala. V kulturních výsadbách byl nejméně rozšířen ApMV, konkrétně v zahradách infikoval 14 vzorků (37 %) a v sadech 25 stromů (17 %). U volně rostoucích jabloní nebyla přítomnost žádného z virů vyšší než 9 % (ASPV).

Sekvenční identita nukleotidů a od nich odvozených aminokyselin pro gen obalového proteinu byla u námi získaných virových izolátů z jabloní vysoká a to u všech sledovaných virů. Ani v jednom případě nebyl pozorován rozdíl mezi kulturními a planými izoláty. Sekvenční identita těchto izolátů se ani výrazně nelišila od již dříve publikovaných izolátů z jabloní získaných z NCBI. Nebyl tedy potvrzen žádný vztah mezi geografickým původem izolátů, což naznačily i již dříve provedené studie (Ferreti *et al.*, 2010; Gadiou *et al.*, 2010; Grimová *et al.*, 2013; Komorowska *et al.*, 2011).

5. Závěry a doporučení

V rámci disertační práce se podařilo optimalizovat metodu qRT-PCR pro spolehlivou detekci a kvantifikaci čtyř významných virů, jmenovitě ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV, na jabloních. Ukázalo se, že metoda qRT-PCR je pro detekci studovaných virů nejspolehlivější, bylo možné ji použít celoročně a se všemi uvedenými rostlinnými materiály.

Při relativní kvantifikaci DAS/I-ELISA a RT-PCR metodou bylo u všech virů možné pozorovat změny v koncentraci v průběhu roku a i v závislosti na použitém rostlinném materiálu. Metodou qRT-PCR se u ASGV, ASPV a ACLSV nepotvrdilo, že by v průběhu roku docházelo ke změnám v koncentraci virů v rostlinách. U ApMV byly zaznamenány mírné změny v obsahu viru v průběhu roku metodou qRT-PCR. Je proto pravděpodobné, že pouze koncentrace ApMV není v průběhu roku v rostlinách stálá a mohla by tedy ovlivňovat spolehlivost detekčních metod. Rozdíly v koncentraci virů v různém rostlinném materiálu byly metodou qRT-PCR zaznamenány pouze u ACLSV, kde byl vyšší obsah viru v květech.

V rámci monitoringu se podařilo ApMV, ASGV, ASPV a ACLSV detekovat pouze ve vzorcích z jabloní. Viry byly rozšířeny především v kulturních výsadbách jabloní (v sadech a zahradách) a to bez ohledu na stáří výsadby. U volně rostoucích stromů bylo rozšíření virů prokazatelně nižší. Tyto výsledky naznačují, že velký vliv na šíření virů má člověk při zakládání a údržbě výsadby stromů.

Při fylogenetických analýzách a studiu molekulární variability izolátů studovaných virů z jabloní se neukázaly výraznější rozdíly mezi námi nově osekvenovanými izoláty a staršími izoláty uvedenými v databázi NCBI. V případě izolátů ApMV a ASGV lze rozdíly považovat za minimální; nebyl u nich pozorován ani žádný vztah ke geografickému původu vzorků nebo typu výsadby jabloní (volně rostoucí x kulturní). U ASPV a ACLSV byla různorodost izolátů vyšší, ale to pravděpodobně souvisí s vyšší variabilitou genu CP těchto virů, protože ani v případě izolátů těchto dvou virů nelze nalézt vztah mezi geografickým původem izolátů případně typem výsadby jabloní.

6. Seznam publikací

- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2016: Quantitative detection of four pome fruit viruses by one-step qRT-PCR in apple trees throughout the year. *Phytopathologia Mediterranea*. V TISKU
- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P.; 2016: Apple mosaic virus – Review. *Phytopathologia Mediterranea*. V TISKU
- Grimová L., Winkowska L., Ryšánek P., Svoboda P., Petrzik K., 2013: Reflects the coat protein variability of apple mosaic virus host preference? *Virus genes* 47:1, 119–125 s.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P., 2013: Virus mozaiky jabloně. *Zahradnictví* 11, 14-17 s.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2015: Detekce významných virů jabloní metodou real-time RT-PCR. Sborník abstraktů na XX. Českou a Slovenskou konferenci o ochraně rostlin; Praha; 42 p.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2015: Detection and quantification of several apple viruses by real-time RT-PCR. Sborník abstraktů na konferenci 23rd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops; Morioka, Japan; 113 p.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P.; 2014: Seasonal changes in the concentration of Apple mosaic virus in apple trees. Sborník abstraktů na konferenci 11th European Foundation of Plant Pathology; Krakow, Poland; 224 p.

7. Literatura

- Akbas B., Ilhan D., Atlamaz A. 2004. A preliminary survey for hazelnut (*Corylus avellana* L.) viruses in Turkey. *6th International Congress on Hazelnut; Tarragona* 2004. 94 p.
- Arntjen A., Jelkmann, W. 2010. Investigation of virus occurrence in different tissues throughout the year and sequence variability of *Apple stem pitting virus*. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kuhn Archiv 427.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Robaglia, C., Lecoq, H. 2007. Principles of Plant Virology. Genome, Pathogenicity, Virus ecology; Science publisher, Enfield, 472p. ISBN 978-1-57808-503-3.
- Crop Protection Compendium 2003. CAB International 2003, Wallingford, Oxon, UK.
- Desvignes, J. C. 1999. Maladies a virus de arbes fruitiers. CTIFL.
- Dhingra K. L. 1972. Transmission of *Apple mosaic virus* by natural root grafting. Indian journal of horticulture 29. 348 – 350 p.
- EPPO 1991. Certification schemes Virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks. EPPO Bulletin 2. 267–277 p.
- EPPO 1999. Certification schemes-Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. EPPO Bulletin 29. 239–252 p.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution vol. 39.783-791p.
- Ferretti, L., Hallan, V., Rana, T., Ram, R., Dhir, S., Negi, A., Lakshmi, V., Thockchom, T., Zaidi, A.A., Barba, M. 2010. Nucleotide analysis of pome fruit virus isolates detected in apple and pear samples from Italy and India. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius Kuhn Archiv 427. 230-236 p.
- Fulton R. W. 1972. *Apple mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of plant viruses 83, UK.
- Gadiou, S., Kundu, J. K., Paunovic, S., Garcia-Diez, P., Komorowska, B., Gospodaryk, A., Handa, A., Massart, S., Birisik, N., Takur, P. D., Polischuk, V. 2010. Genetic diversity of flexiviruses infecting pome fruit trees. Journal of Plant Pathology 92. 685-691 p.
- Grimová, L., Winkowska, L., Ryšánek, P., Svoboda, P., Petrzik, K. 2013. Reflects the coat protein variability of *Apple mosaic virus* host preference? Virus Genes 47. 119–125 p.
- Hadidi A., Barba, M., Candresse, T., Jelkmann, W. 2011. Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone fruits. St. Paul, Minnesota U.S.A., American Phytopathological Society Press. 428 p.
- James, D. 1999. A simple and reliable protocol for the detection of *Apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. Journal of Virology Methods 83. 1–9 p.
- Jarošová J., Kundu J. K. 2010. Detection of *Prune dwarf virus* by one-step RT-PCR and its quantification by real-time PCR. Journal of virological methods 164. 139 – 144 p.

- Jelkmann W., Kunze L., Vetten H. J., Lesemann D. E. 1992. cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. *Acta horticulturæ* 309. 55-62 p.
- Jelkmann, W., Keim-Konrad, R. 1997. An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Phytopathology* 145. 499–504 p.
- Kinard, G. R., Scott, S. W., Barnett, O. W. 1996. Detection of *Apple chlorotic leaf spot* and *Apple stem grooving viruses* using RT-PCR. *Plant Diseases* 80. 616-621 p.
- Kirby, M. J., Guise, C. M., Adams, A. N. 2001. Comparison of bioassays and laboratory assays for *Apple stem grooving virus*. *Journal of Virology Methods* 93.167–173 p.
- Komorowska, B., Siedlecki, P., Kaczanowskic, S., Hasiow-Jaroszewska, B., Malinowski, T. 2011. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of Apple stem pitting virus. *Virus Research* 158. 263–267 p.
- Komorowska B., Malinowski T., Michalczuk L. 2010. Evaluation of several RT-PCR primer pairs for the detection of *Apple stem pitting virus*. *Journal of Virological Methods* 168. 242-247 p.
- Kundu, J. K., Svoboda, J., Polák, J. 2003. Detection of *Apple stem grooving virus* from different tissues of apple trees throughout the year. *Plant Protection Science* 39. 93-96 p.
- Kundu J.K., 2003(a). A rapid and effective RNA release procedure for virus detection in woody plants by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Virologica* 47, 147-51.
- Kundu, J. K. 2003(b). The Occurrence of *Apple Stem Pitting Virus* and *Apple Stem Grooving Virus* within Field-Grown Apple Cultivars Evaluated by RT-PCR. *Plant Protection Science* 39 (3). 88-92 p.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0.. *Bioinformatics* vol. 23. 2947–2948p.
- Lee G. P., Ryu K. H., Kim H. R., Kim C. S., Lee D. W., Kim J. S., Park M. H., Noh Y. M., Choi S. H., Han D. H., Lee C. H. 2002. Cloning and phylogenetic characterization of coat protein genes of two isolates of *Apple mosaic virus* from 'Fuji' apple. *Journal of plant pathology* 18. 259 – 265 p.
- Matic S., Sanchez-Navarro J. A., Mandic B., Myrta A., Pallas V. 2008. Tracking three ilarviruses in stone fruit trees throughout the year by ELISA and tissue-printing hybridization. *Journal of Plant Pathology* 90. 137-141 p.
- Marbot S., Salmon M., Vendrame M., Huwaert A., Kummert J., Dutrecq O, Lepoivre P. 2003. Development of Real-Time RT-PCR Assay for Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* in Fruit Trees. *Plant Disease* 87. 1344-1348 p.
- Mathioudakis M. M., Maliogka V. I., Dovas C. I., Vasilakakis M., Katis N. I. 2006. First Record of the *Apple stem pitting virus* (ASPV) in quince in Greece. *Journal of plant pathology* 88. 225 p.

- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virology Methods* 99. 81- 92 p.
- Mink G. I. 1989. *Apple mosaic virus*, in P. R. Fridlund (Ed.); *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders* (pp. 34 – 39). Pullman: Cooperative extension college of agriculture and home economics, Washington state university.
- Neméth M; 1986. *Viruses, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Norwell, MA, USA: Kluwer academic publishers.
- Nickel O., Fajardo T. V.M., Jelkmann W., Kuhn G. B. 2001. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of apple stem grooving virus, and its survey in southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 26. 3 p.
- Polák, J., Svoboda, J. 2006. The reliability of detection and the distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pears in the Czech Republic. *Horticulture Science (Prague)* 33 (1). 7–10 p.
- Polák, J., Zieglerová, J. 2001. Distribution of *Apple stem grooving virus* in apple trees in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 37. 1-4 p.
- Polák, J., Zieglerová, J., Bouma, J. 1997. Diagnosis and distribution of *Apple chlorotic leafspot virus* in pome fruits in the Czech Republic. *Horticulture Science (Prague)* 24. 89-94 p.
- Petrzik, K., Lenz, O. 2002. Remarkable variability of *Apple mosaic virus* capsid protein gene after nucleotide position 141. *Archives of Virology* 147. 1275–1285 p.
- Rott M. E., Jelkmann W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107. 411 – 420 p.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees; *Molecular Biology and Evolution* vol. 4. 406-425p.
- Schwarz K., Jelkmann W. 1998. Detection and characterization of *Apple stem pitting virus* sources from apple and pear by PCR and partial sequence analysis. *Acta Horticulturae* 472. 75-85 p.
- Sutic D. D., Ford R. E., Tosic M. T. 1999. *Virus diseases of fruit trees; Handbook of plant virus diseases*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press. 345 – 347 p.
- Svoboda J., Polák J. 2010. Metodika diagnostiky ApMV, ACLSVa ASGV v odrůdách a podnožích jabloně a hrušně pomocí ELISA. Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. Praha Ruzyně. 25 p.
- Takahashi T., Saito N., Goto M., Kawai M. 1990. Apple stem grooving virus isolated from Japanese apricot (*P. mume*) imported from China. *Res. Bull. Plant Protection Ser. Jpn* 26. 15 – 21 p.
- Thokchom T., Rana T., Hallan V., Ram RR., Zaidi A. A. 2009. Molecular characterization of the Indian strain of *Apple mosaic virus* isolated from apple (*Malus domestica*). *Phytoparasitica* 37. 375 – 379 p.

- Torrance, L., Dolby, C. A. 1984. Sampling conditions for reliable routine detection by enzyme-linked immunosorbent assay of three *Ilarviruses* in fruit trees. *Annals of Applied Biology* 104. 267-276 p.
- Waller, J. M., Lenné, J. M., Waller, S. J.. 2002. *Plant pathologist's pocketbook*; CABI publishing; NY, USA; 3th edition. 516 p. ISBN 0-85199-459-8.
- Watpade, S., Raigond, B., Thakur, P. D., Handa, A., Pramanick, K. K., Sharma, Y. P., Tomar, M. 2012. Molecular detection of *Latent apple chlorotic leaf spot virus* in elite mother plants of apple. *Indian Journal of Virology* 23. 359-363 p.