

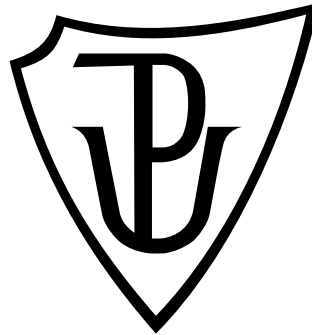
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Monika Opatíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Fytoplazma proliferace jabloně ('*Ca.*
Phytoplasma mali') – molekulárně-genetická
charakteristika fytoplazmy a její vektorů**

Bakalářská práce

Monika Opatíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr.
Dany Šafářovej, Ph.D a za použitia uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa:

Podpis:

Súhrn

Bakalárska práca sa zaoberá štúdiom epidemiológie fytoplazmy proliferácie jablone ('*Candidatus Phytoplasma mali*') so zameraním na jej vektora *Cacopsylla picta* a jeho infekčnosťou, zhodnotením populačnej dynamiky a významom tohto konkrétneho vektora v šírení fytoplazmy v danej lokalite.

Teoretická časť sa zaoberá najprv charakteristikou fytoplaziem ako mikroorganizmov a parazitov rastlín, od ich objavu, cez metódy ich detekcie a identifikácie, taxonómie, prejavov infekcie u hostiteľov a ich ekonomického dopadu. Zameriava sa na fytoplazmu proliferácie jablone, '*Candidatus Phytoplasma mali*', ako významného patogéna jabloní a jej vektorov *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura*. Popisuje ich výskyt, populačnú dynamiku a význam pri prenose fytoplazmy. Nakoniec sa zaoberá výskytom fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma mali*' a jej vektoru *C. picta* v Českej republike.

Praktická časť je zameraná na štúdium významu vektora *Cacopsylla picta* pri prenose fytoplazmy proliferácie jablone v dvoch sadoch s odlišným režimom pestovania. U týchto vektorov bola charakterizovaná ich populačná dynamika, infekčnosť a genetická variabilita získaných izolátov fytoplazmy.

Summary

The bachelor thesis is focused on the epidemiological studies of apple proliferation phytoplasma ('*Candidatus Phytoplasma mali*') especially its vector *Cacopsylla picta*. Experiments were carried out to characterize a population dynamics of this vector and estimate its importance in distribution of phytoplasma in two orchards with different growth management system.

The theoretical part characterizes phytoplasmas as the important plant parasites, their discovery, detection and identification methods, taxonomy, symptoms development and economic impact. It is focused on the one of the most important viral pathogen of apples - '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its vectors *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura*. It describes their occurrence, population dynamics and their significancy in phytoplasma spread. Situation of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its vector *Cacopsylla picta* in the Czech Republic is described in detail.

Experimental part is focused on the evaluation of phytoplasma's vector *Cacopsylla picta* and its relevance in apple proliferation spread in two orchards under different growth management in the Czech Republic. The population dynamics, their phytoplasma infestation and genetic variability of phytoplasma isolates detected in captured vectors were characterized.

Podakovanie:

Rada by som sa poďakovala Mgr. Dane Šafářovej, Ph.D. za jej pomoc, odborné vedenie, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri vypracovávaní mojej bakalárskej práce. Takisto by som chcela poďakovať pani Jane Veselskej za pomoc pri praktickej časti mojej práce a ďalším ľuďom, ktorý mi svojimi pripomienkami pomohli dokončiť túto prácu. Bakalárska práca bola financovaná Interní grantovou agentúrou Univerzity Palackého v Olomouci, v rámci projektu IGA_PrF_2015_003 a v rámci projektu NAZV (MZe) QJ1210209.

Obsah

1. Úvod	8
2. Cieľ práce	9
3. Fytoplazmy – všeobecná charakteristika	10
3.1. Fytoplazmy ako patogény rastlín a história ich objavu	10
3.2. Základná charakteristika a vlastnosti fytoplaziem	10
3.3. Genóm fytoplaziem.....	11
3.4. Klasifikácia fytoplaziem	12
3.5. Metódy štúdia fytoplaziem.....	13
3.6. Hostitelia fytoplaziem	14
3.7. Vektory fytoplaziem	17
3.8. Rozšírenie fytoplaziem, ich ekonomický dopad a kontrola	21
4. Fytoplazma proliferácie jablone (‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’)	23
4.1. Genetická charakteristika a variabilita ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	23
4.2. Hostitelia ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	24
4.3. Vektory ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	26
4.4. Rozšírenie a variabilita ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	31
4.5. Ekonomický dopad ochorení spôsobených ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	33
5. ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’ v Českej republike	34
5.1. Výskyt ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’ v Českej republike	35
5.2. Výskyt vektora ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’ v Českej republike	36
6. Materiál a metódy	38
6.1. Biologický materiál.....	38
6.2. Izolácia DNA	38
6.3. Detekcia fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	39
6.4. Identifikácia fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	41
6.5. Genotypizácia izolátov fytoplazmy ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	42
6.5.1. Gén pre 16S-23S rRNA	43
6.5.2. Gén pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3.....	43
6.5.3. Gén pre nitroreductase- like proteín	43
6.5.4. Gén pre HflB proteázu.....	44
6.5.5. Postupy pri elektroforetickej separácii a RFLP analýze PCR produktov	45
6.6. Sekvenovanie	46

6.6.1.	Izolácia PCR produktov z gélu	46
6.6.2.	Príprava vzoriek na sekvenovanie	47
6.7.	Analýza sekvencií	48
7.	Výsledky	49
7.1.	Detekcia a identifikácia fytoplazmy ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	49
7.2.	Analýza genetickej variability fytoplazmy ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	54
7.2.1.	Gén pre 16S-23S rRNA	54
7.2.2.	Gén pre ribozomálne proteíny rp122-rps3	56
7.2.3.	Gén pre nitroreductase-like proteín	58
7.2.4.	Gén pre HflB proteázu	60
8.	Diskusia	62
9.	Záver	64
10.	Zoznam použitej literatúry	65

1. Úvod

Fytoplazmy predstavujú obligátnych parazitov rastlín rozšírených po celom svete s viac než stovkami hostiteľských druhov. V infikovaných hostiteľských rastlinách vyvolávajú rôzne symptómy v závislosti na mnohých faktoroch, avšak jedným z dôležitých prejavov je znížená kvalita plodov. Dopad fytoplaziem na hospodársky významné druhy rastlín je jednou z príčin, prečo sa toľko štúdií zameralo na identifikáciu týchto patogénov s cieľom nájsť vhodný spôsob ako sa voči nim brániť. Redukcia negatívneho vplyvu fytoplaziem na rastliny vyžaduje v prvom rade ich charakterizáciu, zistenie ich variability, určenie vektorov ich prenosu a pochopenie interakcie s ich hostiteľskými rastlinami a hmyzími vektormi.

‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ spôsobujúca proliferáciu jablone predstavuje fytoplazmu zodpovednú za výrazné poklesy na úrode ovocných stromov, predovšetkým jabloní. Je rozšírená najmä v Európe a jej hlavných vektorov predstavuje hmyz z radu Hemiptera. Práve hmyzie vektory predstavujú hlavný faktor pri rozširovaní fytoplazmy a preto pre účinný boj proti fytoplazme proliferácie jablone je nevyhnutné poznať biológiu týchto vektorov a charakter ich vzájomnej interakcie.

V rámci literárneho prehľadu tejto práce je uvedený popis fytoplaziem so zameraním na fytoplazmu proliferácie jablone, jej hlavných vektorov a situáciu v Českej republike. Hlavnou náplňou experimentálnej časti je detekcia a identifikácia fytoplazmy proliferácie jablone v jej vektore *Cacopsylla picta* a charakterizácia populačnej dynamiky tohto vektora v dvoch sadoch v Českej republike s odlišným režimom pestovania.

2. Cieľ práce

Cieľom v prvej časti mojej bakalárskej práce je vypracovanie literárnej rešerše na tému fytoplazma proliferácie jablone (*Candidatus Phytoplasma mali*) – molekulárno-genetická charakteristika fytoplazmy a jej vektory.

Cieľom praktickej časti je analýza genetickej variability fytoplazmy proliferácie jablone, prenášanej jej hmyzím vektorom *Cacopsylla picta* a charakteristika populačnej dynamiky tohto vektora v sadoch s odlišným režimom pestovania.

3. Fytoplazmy – všeobecná charakteristika

3.1. Fytoplazmy ako patogény rastlín a história ich objavu

Fytoplazmy predstavujú jednobunkové fytopatogénne prokaryotické obligátne parazity, ktoré spôsobujú výrazné škody na mnohých rastlinných druhoch, a ktoré majú celosvetové rozšírenie. Od ich objavu sa im postupne začína venovať viac pozornosti s cieľom potlačiť a eliminovať ich dopad najmä na hospodársky významné rastliny.

Symptómy vyvolané prítomnosťou fytoplazmy v infikovanej rastline boli pozorované dávno predtým, než bola za ich pôvodcu určená fytoplazma. Príznaky infekcie boli obdobné ako pri infekcii vírusmi a preto boli choroby vyvolané fytoplazmami dlhú dobu prisudzované vírusom a považované za vírusové ochorenia (Doi *et al.*, 1967; Lee *et al.*, 2000). Typické infekčné rozširovanie a prenos hmyzom túto teóriu iba potvrdzovali (McCoy *et al.*, 1989; Maramorosch, 2008). Pôvodcovia týchto ochorení boli po prvýkrát pozorovaní pomocou elektrónového mikroskopu v lyku astier s príznakmi žltacky v roku 1967 (Doi *et al.*, 1967). Týmto pozorovaním sa zistilo, že sa nejedná o vírusy a na základe ich podobnosti s mykoplazmami boli označované za mykoplazmám podobné organizmy (MLOs – mycoplasma like organisms) a boli zaradené do triedy Mollicutes. Zmena prišla až v roku 1994, kedy boli na desiatom kongrese The International Organization for Mycoplasmaology premenované na fytoplazmy (Hogenhout *et al.*, 2008).

3.2. Základná charakteristika a vlastnosti fytoplaziem

Fytoplazmy sú pleomorfné mikroorganizmy bez peptidoglykánovej bunkovej steny. Nemajú jednoznačný tvar a tak môžu zaujímať v priestore podobu elipsy, guľôčky či nepravidelnej trubice s priemerom menej ako 1 mikrometer a s variabilnou dĺžkou 200–800 nm (Seemüller, 1990). Jedná sa o jedny z najmenších autoreplikujúcich sa bunkových foriem života prenášaných medzi hosťiteľskými rastlinami buď hmyzími vektormi alebo infikovaným rastlinným materiálom. Diverzifikovali sa z gram-pozitívnych baktérií (IRPCM, 2004). Fytoplazmy sú vnímavé k tetracyklínovým antibiotikám, čo podporuje ich určenie ako prokaryotných mikroorganizmov (Doi *et al.*, 1967; Lee a Davis, 1992).

Fytoplazmy sa vyskytujú vo floéme infikovaných rastlín a hemolymfe hmyzu. Ako floém, tak aj hemolymfa predstavujú pre fytoplazmy izotonické prostredie, kde prebieha aj ich multiplikácia.

3.3. Genóm fytoplaziem

Genóm fytoplaziem je obvyčajne tvorený jednou kruhovou alebo lineárnou dvojláknovou chromozomálnou DNA (Lim a Sears, 1989; 1991; Neimark a Kirkpatrick, 1993). V porovnaní s bežnými baktériami je značne redukovaný, pričom jeho veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 680–1600 kb (IRPCM, 2004).

Genóm fytoplaziem je len vzdialene príbuzný mykoplazmám, ku ktorým boli pôvodne zaradované. Líšia sa napríklad prítomnosťou medzerníku (internal spacer region) medzi 16S a 23S ribozomálnymi oblasťami o dĺžke okolo 300 bp, ktorý kóduje izoleucín-tRNA a časť sekvencie pre alanín-tRNA.

Charakteristickým znakom triedy Mollicutes, ku ktorým patria aj fytoplazmy, je nízky obsah G+C bází (niekedy iba 23 %, čo sa pokladá za hraničnú hodnotu pre životaschopný organizmus). Značne malý genóm fytoplaziem je výsledkom evolúcie súvisiacej s adaptáciou týchto vnútrobunkových parazitov na obligátne spôsob života vo svojich hostiteľoch (Oshima *et al.*, 2004). Redukcia genómu má za následok neprítomnosť niektorých biosyntetických dráh na syntézu živín, ktoré sú nepotrebné v prostredí, ktoré je nimi zásobované (Bai *et al.*, 2006). Pre import týchto metabolitov z hostiteľskej bunky potrebuje fytoplazma transportné systémy. Tieto systémy sa často vyskytujú v niekoľkých kópiách, čo má za následok zvýšený až agresívny transport metabolitov, ktorý následne výrazne narúša metabolickú rovnováhu v rastline a vyvoláva charakteristické symptómy. Dôsledkom straty biosyntetických dráh v priebehu evolúcie je tiež nemožnosť kultivovať fytoplazmy *in vitro* podmienkach na živných pôdach. (Lee a Davis, 1986). Je to charakteristický rys, ktorým sa líšia od spiroplaziem a baktérií.

Bez ohľadu na ich malý genóm nie sú gény pre transportné systémy jediné, ktoré sa u fytoplaziem vyskytujú vo viacerých kópiách. Príkladom môže byť prítomnosť dvoch rRNA operónov, ktoré boli pôvodne považované za identické (Schneider a Seemüller 1994; Smart *et al.* 1996), avšak neskôr bola na základe analýzy RFLP profilov a nukleotidových sekvencií preukázaná ich možná heterogenita (Davis *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 1998; Marcone *et al.*, 2000; Liefing *et al.*, 1996; Jomantiene *et al.*, 2002).

Pre genóm fytoplaziem je takisto charakteristická prítomnosť obrovského množstva transpozónov a inzertných sekvencií (rovnaká kompozícia a podobné gény), v ktorých sa nachádzajú úseky zodpovedné za genómovú variabilitu. Tieto rôzne duplikácie vedú aj k odlišnej veľkosti fytoplazmového genómu medzi fytoplazmami navzájom (Marcone *et al.*, 1999). Hypervariabilné oblasti, ktoré vznikli práve presunom transpozónov

s charakterom mobilných elementov a následnou rekombináciou a preusporiadaním určitých oblastí génov, sú označované ako variabilné mozaiky (SVM) (Jomantiene a Davis, 2006; Jomantiene *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008) alebo potenciálne mobilné jednotky (PMUs) (Bai *et al.*, 2006). Predpokladá sa, že práve odlišná regulácia expície génov v týchto oblastiach umožňuje evolúciu fytoplaziem, vznik ich genetickej variability, schopnosť adaptovať sa na nové hostiteľské druhy a zároveň umožňuje fytoplazmám prežiť v tak rozdielnych prostrediach, ktoré pre ne predstavuje hostiteľská rastlina a hmyzí vektor. Príkladom takéhoto prispôsobenia sa fytoplazmy odlišným podmienkam prostredia môže byť fytoplazma ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ kmeň OY-M, u ktorej bola microarray analýzou preukázaná výrazná zmena v génovej expresii v odpovedi na jej hostiteľa. Bola zistená rozdielna expresia až 33 % génov pri porovnaní hostiteľskej rastliny a hmyzieho vektora tejto fytoplazmy (Oshima *et al.*, 2011).

3.4. Klasifikácia fytoplaziem

Zaradenie a taxonómia fytoplaziem bola dlho nejasná. Pripomínajú síce mykoplazmy saprofytujúce na živočíchoch (od toho odvodený názov MLOs: mycoplasma-like organisms, dnes už zastaraný), ale z pohľadu štruktúry ich genómu sú s nimi len vzdialene príbuzné. Až aplikácia molekulárnych technológií viedla k novému triviálnemu pomenovaniu ‘fytoplazma’ a ich zaradeniu do radu Achleplasmatales v rámci triedy Mollicutes a napokon k stanoveniu nového taxónu nazvaného ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (IRPCM, 2004). Za ich najbližšieho spoločného predka s baktériami sa na základe fylogenetických štúdií považuje *Achleplasma laidlawii* (Razin *et al.*, 1998).

Detailnejšie rozlíšenie medzi jednotlivými fytoplazmami, poznanie ich variability a genetických vzťahov, umožnili techniky založené na analýze nukleových kyselín (Lee a Davis, 1988; Lee *et al.*, 1993a). V roku 1994 bolo na základe RFLP analýzy 16S rDNA génu s využitím 17 reštrikčných enzýmov a následnej odlišnosti RFLP profilov 34 dovtedy známych reprezentatívnych kmeňov fytoplaziem rozdelených do 14 hlavných skupín (označených 16Sr skupiny) a 41 podskupín (Ahrens *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993a; Namba *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1994). V súčasnosti sa uvádza celkový počet 28 skupín fytoplaziem (Zhao *et al.*, 2009; *iPhyClassifier*).

Pre detailnejšie rozlíšenie medzi jednotlivými skupinami fytoplaziem sa využíva RFLP analýza iných génov kódujúcich napríklad špecifické ribozomálne či neribozomálne proteíny (Lee *et al.*, 1994; Martini *et al.*, 2002; 2007; Smart *et al.*, 1996). Radia sa medzi ne napríklad gény *SecA* a *SecY* kódujúce ribozomálne proteíny (Clair *et al.*, 2003; Lee

et al., 2006) a gény *aceF* a *tuf* (Martini *et al.*, 2010) kódujúce neribozomálne proteíny (Gundersen *et al.*, 1994; Hodgetts *et al.*, 2008; Marcone *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 1997; Langer a Maixner, 2004).

Systém založený na RFLP analýzach spomínaných génov sa stal najkomplexnejším a celosvetovo rozšíreným pri klasifikácii fytoplazmiem (Lee *et al.*, 2004a; b; Arocha *et al.*, 2005; Al-Saady *et al.*, 2008).

IRPCM v roku 2004 ustanovila pre fytoplazmy samostatný taxón, druh ‘*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*’ a pre zaradenie fytoplazmy ako nového druhu platia nasledujúce pravidlá: popis ‘*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*’ druhu musí odkazovať na jedinú, unikátnu 16S rRNA génovú sekvenciu (>1200 bp) a kmeň môže byť určený za nový druh ak jeho 16S rRNA génová sekvencia má <97,5% identitu k predošlým popísaným ‘*Ca.* *Phytoplasma*’ druhom. Vyskytujú sa však aj prípady, kedy je fytoplazma označená za nový druh aj keď jej sekvenčná podobnosť s existujúcimi ‘*Ca.* *Phytoplasma*’ druhmi je vyššia ako 97,5 %. Takéto zaradenie je ale oprávnené a je prevedené z dôvodu biologickej a ekologickej odlišnosti danej fytoplazmy od známych fytoplazmiem. Z tohto dôvodu je klasifikovanie na základe RFLP analýz často spresňované doplnkovými údajmi ako sú protilátková špecifickosť, okruh hostiteľov, špecifickosť vektorového prenosu alebo inými molekulárnymi kritériami (Seemüller a Schneider, 2004). Do súčasnosti bolo akceptovaných 43 druhov ‘*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*’ (Arocha *et al.*, 2005; 2007; IRPCM, 2004; Valiunas *et al.*, 2006; Al-Saady *et al.*, 2008; Bertaccini *et al.*, 2014; Šafářová *et al.*, 2016a).

3.5. Metódy štúdia fytoplazmiem

Detekcia fytoplazmiem bola v minulosti problematická a to najmä z dôvodu ich nízkej koncentrácie a nerovnomernej distribúcie naprieč sietkovicami infikovaných rastlín či orgánmi hmyzu (Berges *et al.*, 2000). Postupne však dochádzalo k zdokonaľovaniu metód ich štúdia, pričom staršie metódy boli nahradzované novšími metódami poskytujúcimi presnejšie a kvalitnejšie výsledky. Prvé detekcie boli založené na pozorovaní symptómov a spôsobu prenosu ochorenia. Následne sa začala využívať elektrónová mikroskopia ultratenkých rezov floémového pletiva infikovanej rastliny alebo fluorescenčná mikroskopia buniek sietkovic (Lee a Davis, 1992). Prvé dôkladnejšie detekcie boli prevedené až v 80-tych rokoch a to s využitím novo objavených antigénov fytoplazmy v sérologických diagnostických technikách (Hobbs *et al.*, 1987) a metódach založených na princípe ELISA. Na detekciu fytoplazmy boli využívané ako monoklonálne tak aj

polyklonálne antiséra (Lee *et al.*, 1993b; Chen *et al.*, 1993; 1994). Citlivosť týchto metód však nebola dostatočná (Batlle *et al.*, 2004; Fos *et al.*, 1992) a výsledky bolo možné očakávať len pri vysokých koncentráciách fytoplazmy v tkanive či pletive. Najväčší prelom nastal až v 90-tych rokoch s rozvojom klonovania DNA fytoplazmy a celosvetovou aplikáciou sond založených na nukleových kyselinách (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Lee a Davis, 1988; Bertaccini *et al.*, 1990; Bonnet *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1992). Neskôr sa začala využívať PCR metóda (Polymerase chain reaction) spojená s RFLP analýzami (Restriction fragment length polymorphism), ktoré zároveň umožnili dostatočne presnú identifikáciu rozličných druhov fytoplaziem (Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993). Táto metóda je dnes už bežným spôsobom identifikácie fytoplaziem. Jej ďalšími neskoršie používanými variantmi sú napríklad ‘nested‘ PCR (Gundersen *et al.*, 1994), Real-time PCR (Baric *et al.*, 2004; Hren *et al.*, 2007; Firrao *et al.*, 2007), reverzná transkripcia spojená s Real-time PCR (Margaria a Palmano, 2013), aplikácia barcode systému (Makarova *et al.*, 2012) alebo nedávno popísaná metóda LAMP (loop-mediated isothermal amplification) (Tomlinson *et al.*, 2010; Hodgetts *et al.*, 2011).

PCR primery pre detekciu fytoplazmy sú dizajnované na veľmi konzervatívnu oblasť génu pre 16S-23S rRNA zahrňujúcim medzerník (spacer region) (Smart *et al.*, 1996; Ahrens *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 1991; Jomantiene *et al.*, 1998; Schaff *et al.*, 1992) a dnes sú bežne využívané na ich identifikáciu.

3.6. Hostitelia fytoplaziem

Fytoplazmy sú zodpovedné za viac než 300 rôznych ochorení (Hoshi *et al.*, 2007) u viac ako niekoľko stoviek rastlinných druhov (Seemüller *et al.*, 2002). Sú rozšírené najmä v Európe a napádajú ako stromy a dreviny (ESFY, PD, AP), tak aj jednoročné a trváce rastliny (AY, stolbur). Spôsobujú tak škody pri pestovaní zeleniny, ovocia, okrasných rastlín, lesných porastov či tieňomilných rastlín (Ahrens *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1998b; Errampalli *et al.*, 1991; Zreik *et al.*, 1995).

Interakcie hostiteľa – patogén fytoplaziem

Charakter prejavu prítomnosti fytoplazmy v konkrétnej rastline závisí od vzájomnej interakcie hostiteľa a patogéna. V priebehu evolúcie si ako hostitelia tak aj paraziti vytvorili rozličné stratégie, aby sa vyhli alebo minimalizovali vzájomný škodlivý účinok.

Predpokladá sa, že pri rozoznávaní Mollicutes a ich adherencii k rastlinným alebo hmyzím hostiteľským bunkám zohrávajú úlohu ich povrchové epitopy

imunodominantných membránových proteínov (Imp), ktoré sú pre každý fytoplazmový druh/kmeň unikátne, čím sa stávajú akousi prerekvizitou pre kolonizovanie a infekciu. Závisí od nich patogenita fytoplazmy a ovplyvňujú rezistenčné odpovede hostiteľských organizmov (Christensen *et al.*, 2005). Tieto membránové proteíny sa vyskytujú u fytoplazmiem vo vysokom počte a sú v priamom kontakte s ich hostiteľom, z čoho vyplýva aj ich kľúčová úloha v šírení fytoplazmy v rámci rastliny a hmyzieho hostiteľa (Conci *et al.*, 2014). Imunodominantné proteíny sú delené do troch skupín: 1) imunodominantný membránový proteín (Imp), detekovaný napríklad u fytoplazmiem asociovaných s metlovitosťou sladkých zemiakov (SPWB) (Christensen *et al.*, 2005), proliferáciou jablone (AP) (Berg *et al.*, 1999), Európskou žltáčkou jablone (ESFY), chradnutím hrušky (PD); 2) imunodominantný membránový proteín A (IdpA), detekovaný u fytoplazmiem asociovaných s 'western X-disease' (WX) (Blomquist *et al.*, 2001); a 3) antigénový membránový proteín (Amp), detekovaný napríklad u fytoplazmiem žltáčky astier (AY), 'clover phyllody' (CPh), a 'onion yellows' (OY) fytoplazmách (Morton *et al.*, 2003; Barbara *et al.*, 2002).

Štúdie preukazujú, že fytoplazma môže značne ovplyvniť hostiteľskú rastlinu vo svojom prospechu. Jednou z možností je redukcia v produkcii obranných látok, ktoré odpudzujú hmyz živiaci sa floémom alebo znižujú jeho fitness. Takéto rastliny sa stávajú lákavejšími pre tieto vektory a hmyz ich prednostne vyhľadáva (Weintraub a Beanland, 2006). Druhou možnosťou na prilákanie hmyzu je zvyšovanie syntézy ľahko stráviteľných živín v hostiteľských rastlinách. Dané rastliny navyše vykazujú príznaky infekcie ako je napríklad chloróza listov a pre hmyz je tak jednoduchšie rozlíšiť infikované rastliny od neinfikovaných (Todd *et al.*, 1990).

Pre správnu funkciu celého systému komplexných vzťahov medzi vektorom, hostiteľskou rastlinou a fytoplazmou, musia byť splnené nasledujúce 3 podmienky: (1) prítomnosť vnímavej hostiteľskej rastliny v danom čase (sezóne) a geografickom priestore; (2) prítomnosť patogéna a (3) prítomnosť vektora. Aktivitu a účasť každého z troch komponentov sprostredkovávajú environmentálne podmienky. Je samozrejmé, že by hmyz opustil vhodnú hostiteľskú rastlinu iba v prípade, že by ho k tomu donútili biotické (prehustenie populácie, vývojové štádium, genetická tendencia k migrovaniu) alebo abiotické faktory (Weintraub a Beanland, 2006).

Symptómy hositeľských rastlín infikovaných fytoplazmou

Vplyv prítomnosti fytoplaziem sa u rastlín prejavuje na úrovni buniek a pletív rôznym spôsobom. Primárne môžu viesť k produkcii defektných proteínov, zvýšenej nadprodukcii fenolických zložiek a hydrogén peroxidu v hositeľských rastlinách (Junqueira *et al.*, 2004; Musetti *et al.*, 2000; 2005). Ďalšími faktormi, ktoré negatívne ovplyvňujú hositeľské rastliny infikované rôznymi fytoplazmami sú: redukcia koncentrácie fotosyntetických pigmentov (Bertamini a Nedunchezian, 2001), zmeny v hormonálnej rovnováhe (Maust *et al.*, 2003; Jagoueix *et al.*, 2001) či v transporte aminokyselín (Lepka *et al.*, 1999). Výskyt fytoplazmy vo floéme navyše ovplyvňuje a narušuje transport karbohydrátov v sietkoviaciach (Bertamini a Nedunchezian, 2001).

Na úrovni celého organizmu môžeme pozorovať charakteristické žltnutie a červenanie listov, menšiu veľkosť listov a celkovo zakrpatený vzrast rastliny, skracovanie alebo abnormálne predlžovanie internódií, proliferáciu mladých výhonkov, metlovitý charakter rastu, sterilitu kvetov, úpadok až úhyn rastliny (Bertaccini *et al.*, 2001; 2005; 2007). Typická je aj listová proliferácia, produkcia listom podobným útvarov na mieste kvetov, spôsobená dereguláciou génov riadiacich formovanie kvetov (Pracros *et al.*, 2006). Nekróza podzemnej časti rastliny spravidla predchádza prejavom infekcie v nadzemnej časti rastliny. Intenzita a charakter symptómov závisí ako na druhu hositeľa, tak aj na druhu fytoplazmy a štádiu infekcie (Lee *et al.*, 2000).

Na druhej strane môže fytoplazma spôsobiť veľa nešpecifických symptómov vyvolaných stresom rastliny. Niektoré symptómy spôsobené fytoplazmou boli po určité obdobie využívané aj pre komerčnú produkciu; zredukovaná veľkosť niektorých konkrétnych rastlín ako následok infekcie fytoplazmou umožnila ich pestovanie v kvetináčoch. Príkladom je Prýštec najkrajší (*Euphorbia pulcherrima*, Willd. ex Klotzsch). Divoký typ predstavuje strom, pričom infekcia fytoplazmou zo skupiny 16SrIII, 'peach X-disease', umožňuje pestovanie tejto rastliny v kvetináčoch a spôsobuje charakteristické potlačenie apikálneho rastu a tvorbu listových ružíc (Bertaccini *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1995; 1997).

Distribúcia fytoplazmy v hositeľskej rastline

Fytoplazmy sa vyskytujú vo floéme sietkovic, ich distribúcia je však často v hositeľovi nerovnomerná rovnako ako aj ich koncentrácia (Seemüller *et al.*, 1984). Fytoplazmy sú schopné pohybovať sa v rámci rastliny vo floéme a kolovať spolu s asimilačným tokom smerom od zdroja do sinku. Ich pleomorfný tvar a minimálna veľkosť im umožňuje voľne

prechádzať cez póry v sietkoviach (Christensen *et al.*, 2004). S týmto javom súvisí typické sezónne kolísanie populácie patogéna v drevinách ako aj každoročná redistribúcia fytoplazmy v rastline po zimnom období (Guthrie *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1984). Existujú však výnimky, u ktorých sa fytoplazmy vyskytujú v nadzemných častiach rastlín aj počas zimy, príkladom sú druhy rodu *Prunus* (Jarausch *et al.*, 1999a). Bolo tiež preukázané, že existujú rozdiely v množstve fytoplazmovej DNA medzi jednotlivými rastlinami infikovanými z jednej a tej istej rodičovskej rastliny (Christensen *et al.*, 2004).

Vegetatívne šírenie fytoplaziem medzi hostiteľskými rastlinami

Odhladiac od vektorov sa fytoplazmy šíria vegetatívne infikovaným rastlinným materiálom, napríklad prostredníctvom štepov a očiek, rezaním alebo mikropropagáciou (CABI, 2015). U niektorých kmeňov fytoplaziem bol potvrdený aj prenos semenami (Cordova *et al.*, 2003), avšak obecné sa nepredpokladá, že by sa fytoplazmy mohli šíriť týmto spôsobom z dôvodu neexistujúceho priameho spojenia sietkovic kvetných častí a vyvíjajúceho sa embrya.

3.7. Vektory fytoplaziem

Vektory prenosu sa líšia závisiac od typu fytoplazmy, ktorú prenášajú, od populácie vektora, od geografického rozšírenia a iné. Fytoplazmy sú prenášané rôznymi zástupcami bodavo-savého hmyzu z radu Hemiptera (Hemipteroidný komplex, ktorý spolu s Thysanoptera patrí do skupiny Condylgnatha), ale iba vybranými čeľad'ami z podradu Auchenorrhyncha: Deltocephalinae, Cercopidae, Cixiidae, Derbidae, Delphacidae, Cicadellidae a Sternorrhyncha: Psyllidae (Weintraub a Beanland, 2006). Pre tieto skupiny sú charakteristické 2 znaky: a) Patria medzi hemimetabola (nymfy a dospelce sa krmia obdobne a v tej istej lokalite – fytoplazmy môžu prenášať ako nedospelé jedince tak aj dospelce (Tedeschi a Alma, 2004); b) Krmia sa špecificky a selektívne na určitých pletivách rastlín, čo im umožňuje byť efektívnymi vektormi patogénov, ktoré sa v nich zdržiavajú. Navyše ich krmenie nemá deštruktívny charakter, úspešne inokulujú hostiteľskú rastlinu bez poškodenia vodivého pletiva a vyvolania obranných odpovedí. (Weintraub a Beanland, 2006).

Niektoré fytoplazmy sú známe širokým okruhom hmyzích vektorov, zatiaľ čo iné môžu mať iba jedného. Dokonca aj v rámci druhu môžu odlišné populácie, najčastejšie geograficky oddelené, byť kompetentným vektorom patogéna len v jednej oblasti a v inej oblasti fytoplazmu neprenášajú. Je nutné si tiež uvedomiť, že je oveľa viac popísaných

druhov fytoplaziem ako je identifikovaných vektorových druhov (Weintraub a Beanland, 2006).

Pri štúdiu vektorov fytoplazmy je nevyhnutné poznať ich ekológiu: životný cyklus a dynamiku druhu a populácie, ich priestorové rozšírenie, sezónne a denné presuny, prirodzenú infekčnosť vektorov, ako aj identifikovať vektorov nových. A čo viac, pri detekcii infekčnosti vektorov treba rozlišovať medzi jedincami, ktoré fytoplazmu prenášajú, a u ktorých bola iba potvrdená jej prítomnosť. Z testu môže vyjsť pozitívny aj jedinec, u ktorého sa fytoplazma vyskytuje kdekoľvek pozdĺž jeho tráviaceho traktu alebo jedinec, ktorý predstavuje konečného hostiteľa fytoplazmy. Oba tieto jedince na rozdiel od inokulujúceho vektora fytoplazmu neprenášajú a nie sú teda predmetom záujmu štúdií zameraných na šírenie fytoplazmy. Na dôvažok pozostatky fytoplazmovej DNA zotrvávajú v tele hmyzu aj dlho po tom, čo fytoplazma stratila životaschopnosť a schopnosť amplifikovať sa (Weintraub a Beanland, 2006).

Interakcie vektor, patogén a hostiteľská rastlina fytoplazmy

Interakcie medzi hmyzom, fytoplazmami a hostiteľskou rastlinou sú komplexné a variabilné. Komplexný sled udalostí nevyhnutných pre získanie a následné prenášanie fytoplazmy hmyzom na rastliny vyžaduje vo väčšine prípadov vysoký stupeň odpovedajúcej špecifity medzi hmyzím vektorovým druhom a fytoplazmou, ktorú prenáša. Existujú však výnimky, kedy interakcia medzi hmyzom a fytoplazmou vôbec nie je špecifická a výsledkom je možnosť prenosu jedného typu fytoplazmy viacerými vektormi, ako bolo preukázané napríklad pre kmene fytoplazmy žltáčky astier alebo fytoplazmy 'wester X-disease' v Severnej Amerike (Ebbert *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1996). V rámci hmyzu rozlišujeme monofágne a polyfágne vektory, pričom druhá spomínaná skupina má potenciál inokulovať široký okruh rastlinných hostiteľov. Na dôvažok jeden druh vektora môže prenášať dve alebo viac rôznych fytoplaziem alebo samotný jedinec môže byť infikovaný zmesou fytoplazmových kmeňov (Ebbert *et al.*, 2001).

Medzi patogénom a vektorom sa na charaktere interakcií významne podieľajú antigénové membránové proteíny fytoplaziem, ktoré formulujú komplexy s mikrofilamentami črevných svalov konkrétneho hmyzu. Existencia tohto komplexu je v korelácii so schopnosťou vektorov prenášať príslušnú fytoplazmu (Suzuki *et al.*, 2006; Hoshi *et al.*, 2007). Imunodominantné proteíny fytoplaziem vykazujú značnú antigénovú variabilitu na základe čoho sa dá usudzovať prítomnosť selektívnej adaptácie parazita na vyhnutie sa imunitnému systému hmyzieho vektora. (Kakizawa *et al.*, 2009). Na druhej

strane niektoré štúdie preukázali, že zatiaľ čo v prirodzených podmienkach sa hmyz na určitých rastlinných druhoch nekrmí, v laboratórnych podmienkach môže svoje správanie zmeniť a z takejto rastliny fytoplazmu získať a ďalej ju prenášať. Z tohto dôvodu je teda v mnohých prípadoch limitujúci v šírení fytoplazmy skôr hostiteľský okruh vektorov fytoplazmy než nedostatok fytoplazma-špecifických bunkových membránových receptorov spomínaných vyššie (Bosco *et al.*, 1997; Marzachi *et al.*, 1998).

Fytoplazma môže mať na svojho vektora v rámci jeho fitness rôzny dopad. Tento vzájomný vzťah môže byť pre hmyz výhodný, škodlivý alebo neutrálny. Prvotné štúdie naznačovali, že infekcia bola pre hmyz škodlivá, patogén mal v ojedinelých prípadoch pre svojho hmyzieho hostiteľa letálne účinky (Madden *et al.*, 1984; Severin, 1946). Súčasné štúdie preukazujú, že na hmyze infikovanom fytoplazmou sa obvykle neprejavujú žiadne symptómy a fytoplazmy môžu určitým spôsobom aj prispievať na zvyšovanie ich fitness (Christensen *et al.*, 2005). Tento vplyv môže byť rozdielny v závislosti na tom, či sa jedná o ich primárneho alebo sekundárneho vektora (Madden *et al.*, 1984). Dôležitú úlohu tiež zohráva vplyv teploty okolitého prostredia, ktorá tiež môže pozmeniť interakciu medzi nimi, pričom rozdiel je v tom, či na svojho vektora bude alebo nebude mať zhubný vplyv (Garcia-Salazar *et al.*, 1991).

Na úrovni konkrétnej záujmovej oblasti je presun a pohyb vektorov ovplyvnený rozložením hostiteľských rastlín. Pravdepodobne kratšie vzdialenosti medzi preferovanými rastlinami zvyšujú tendenciu hmyzu k presúvaniu medzi nimi (Power, 1992).

Vplyv, aký má fytoplazma na hmyzieho vektora, určuje aj rozšírenie samotnej fytoplazmy. Dlhšie žijúce vektory sú schopné infikovať viac potencionálnych hostiteľských rastlín a produkovať viac potomkov. Evolučne úspešnejšie sú teda fytoplazmy, ktoré nezabývajú svojho nositeľa a predpokladá sa, že takéto fytoplazmy prešli dlhším koevolučným vývojom (Weintraub a Beanland, 2006).

Mechanizmus šírenia fytoplazmy vektormi

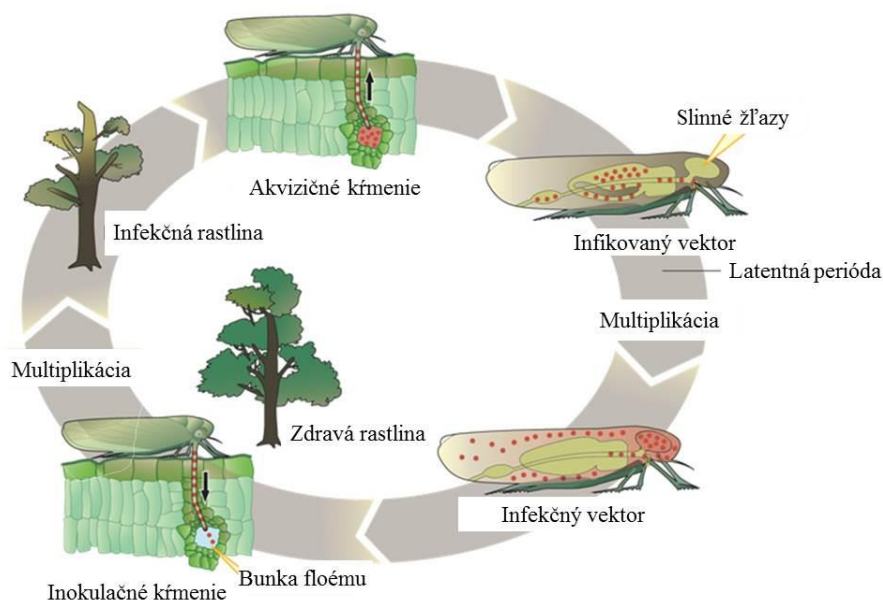
Spôsob šírenia fytoplazmy v infikovanom jedincovi ako aj spôsob, akým túto infekciu získava a prenáša na ostatné hostiteľské rastliny súvisí so samotnou distribúciou fytoplazmy vo vektore. Fytoplazma je u infikovaných jedincoch prítomná v hemolymfe, slinných žľazách a rôznych ďalších orgánoch. Schopnosť prenášať tohto patogéna získava vektor po saní na infikovanej rastline. Dĺžka sania nevyhnutná k získaniu dostatočného titru fytoplazmy je označovaná ako akvizíčná perióda (AAP). Jej trvanie môže

predstavovať pár minút, ale bežne je meraná v hodinách, a čím dlhšie AAP perióda trvá, tým je väčšia šanca, že hmyz získa dostatočné množstvo fytoplazmy (Purcell, 1982).

Patogén prítomný vo floéme prechádza počas sania cez styletu do ústnej dutiny vektora, kde penetruje epitelové bunky a kde zároveň prebieha jeho prvá replikácia. Z ústnej dutiny pokračuje patogén až do čreva tráviacej sústavy hmyzu, kde jeho multiplikácia pokračuje. Ďalej pokračuje buď cez stenu enterocytov alebo paracelulárne medzi enterocytmi (Lefol *et al.*, 1993) a dostáva sa do hemolymfy. Postupne infikuje vnútorné orgány ako napríklad malpigické trubice (Lherminier *et al.*, 1990), tukové teliesko, mozog (Lefol *et al.*, 1993; Nakashima a Hayashi, 1995) alebo reprodukčné orgány (Kawakita *et al.*, 2000).

Na to, aby bola fytoplazma prenášaná vektorom na ďalšie rastliny, musí v konečnom dôsledku penetrovať bunky slinných žliaz, kde sa začne multiplikovať až kým dosiahne určitú úroveň – infekčný titer (Kirkpatrick, 1992). Fytoplazma prechádza tromi bariérami: bazálnou laminou, bazálnou plazmalémou a apikálnou plazmalémou a je následne uvoľňovaná so slinami zo slinných žliaz (Lefol *et al.*, 1993; Vega *et al.*, 1993; 1994). Práve zo slín sa dostáva fytoplazma do ďalšieho rastlinného hostiteľa (Tsai, 1979). Príklad životného cyklu fytoplazmy zahŕňajúceho hmyzieho vektora vid' obrázok 1.

Obrázok 1: Životný cyklus fytoplazmy (Oshima *et al.*, 2011)



Inkubačná doba, počas ktorej sa patogén multiplikuje v tele vektora, ale vektor ho neprenáša, trvá rôzne dlhú dobu, približne 10 až 45 dní a predstavuje latentnú periódu. Dĺžka latentnej periódy závisí na teplote prostredia, pri teplotách nižších (10 °C) trvá

inkubačná doba najdlhšie, pri vyšších teplotách (30 °C) je inkubačná doba najkratšia (Murrall *et al.*, 1996; Nagaich *et al.*, 1974). Po uplynutí inkubačnej doby je vektor schopný prenášať fytoplazmu (Carraro *et al.*, 2001) a je schopný prenosu tohto patogéna viac-menej až do konca svojho života. Vektory tak prenášajú fytoplazmy cirkulatívne, perzistentne a propagatívne. Mimo iné boli zaznamenané aj prenosy transovariálne pre určité kombinácie vektorov a chorôb, ktoré spôsobujú, napríklad pre *Scaphoideus titanus* a žltáčku astier (Danielli *et al.*, 1996; Alma *et al.*, 1997); *Hishimonoides sellatiformis* a 'mulberry dwarf' (Kawakita *et al.*, 2000) alebo *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) a 'sugarcane white leaf' (Hanboonsong *et al.*, 2002).

3.8. Rozšírenie fytoplaziem, ich ekonomický dopad a kontrola

Choroby súvisiace s fytoplazmou sú rozšírené celosvetovo, avšak konkrétne fytoplazmy môžu byť limitované v ich hostiteľskom okruhu a distribúcii v konkrétnej oblasti. V jednotlivých krajinách sú rôzne podmienky a rôzna úroveň výskytu fytoplazmových ochorení a preto sa aj snahy obmedziť negatívny dopad fytoplaziem na hospodársky významné plodiny líšia.

Kontrola fytoplazmových ochorení je náročná z dôvodu ich floémovej povahy. Citlivá a presná detekcia týchto mikroorganizmov, aktualizované znalosti distribúcie ochorení ako aj prítomnosť a status vektora sú veľmi dôležité na odhad rizika škodcu, fytošaniárne rozhodnutia a rozvoj manažmentu s fytoplazmou súvisiacich chorôb. Zakladajú sa databáze, ktoré pomáhajú pochopiť epidemiológiu fytoplazmy. Objavujú sa nové a nové typy fytoplaziem a s fytoplazmami súvisiace vektory. Vylepšujú sa techniky, ktoré pomáhajú identifikovať prítomnosť či už v rastlinnom alebo živočíšnom materiáli. Z dôvodu ich devastujúceho účinku na hospodársky významnú produkciu ovocia, zeleniny, ale aj kultúrnych a okrasných rastlín bolo nutné založiť a určiť medzinárodné obmedzenia a karanténne regulácie (Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007). Kontrola epidemického vypuknutia fytoplazmových ochorení môže byť prevedená teoreticky najprv kontrolou vektorov alebo elimináciou patogéna z infikovaných rastlín prostredníctvom meristémových kultúr, antibiotikami alebo inými chemikáliami (Bertaccini, 2007). Typické opakované ošetrovanie infikovaných rastlín antibiotikami tetracyklínovej povahy je však dnes už buď obmedzené alebo zakázané (v závislosti na krajine) v jeho praktickej aplikácii z dôvodu ich fytotoxicity. Ich dlhodobé používanie by navyše mohlo viesť k vzniku rezistentných kmeňov fytoplaziem voči používanému antibiotiku. Preto sa vyvinula snaha o produkovanie fytoplaziem prostého materiálu alebo nájdením fytoplazma

- rezistentných odrôd za účelom indukcie rezistencie u rastlín (Dai *et al.*, 1997; Kison a Seemüller, 2001; Jarausch *et al.*, 1999b; Seemüller *et al.*, 2007).

Základom úspešnej ochrany je pochopenie mechanizmu rezistencie hositeľských rastlín, selektovanie rastlín s rezistenciou voči patogénu ako aj voči hmyzím vektorom, zistenie v čom sa líši rezistentná odpoveď na iné patogény od tých na fytoplazmu (Garnier *et al.*, 2001). Skúmajú sa účinky biotických a abiotických environmentálnych faktorov na ochorenie a rozvoj symptómov, pracuje sa na rozvoji nízko-dopadových insekticídov a ošetrovateľských plánov, študujú sa interakcie endofytov s hositeľskými rastlinami a skúma sa, či mierny fytoplazmový kmeň môže účinne ochrániť rastlinu pred infekciou silne virulentným fytoplazmovým kmeňom (Jarausch a Torres, 2014). Štúdium miernych a silne virulentných kmeňov je však problematické a to z dôvodu, že staršie stromy sú kvôli opakovanej inokulácii vektormi infikované väčšinou viacerými rôznymi kmeňmi s rôznym stupňom virulencie a ich pomerné zastúpenie v napadnutej rastline sa v priebehu času mení (Schlesingerová, 2011).

Kontrola fytoplazmových vektorov

Pre kontrolu šírenia fytoplaziem je nevyhnutná kontrola ich vektorov pomocou rôznych opatrení. Väčšinou sú proti nim využívané insekticídne látky, pričom súčasné využívanie pesticídov a insekticídneho ošetrovania zďaleka nestačí na kontrolu fytoplazmových ochorení (Firrao *et al.*, 2007) a v protiklade k tomu stojí aktuálna snaha redukovať dopad insekticídov a prejsť k ekologickým stratégiám pri pestovaní (Jarausch a Torres, 2014). Priame odstraňovanie zdrojov inokula sa osvedčilo iba v prípade fytoplaziem prenášaných monofágny hmyzom, takmer nepredstaviteľné je využitie tejto metódy u polyfágneho hmyzu, ktorý sa navyše kŕmi na divoko rastúcich rastlinách, ktorých rezervoáre sú často neznáme. Jedným z cieľov je súčasne pochopenie a identifikácia bariér proti fytoplazmovej kolonizácii tela hmyzu s využitím pri tvorbe účinných stratégií na redukcii infekčnosti hmyzej populácie. Napriek rade problémov predstavuje dnes kontrola vektorov prenosu fytoplazmy najúčinnější spôsob ako obmedziť rozšírenie fytoplazmy v prípade ovocných stromov a viniča. V prvom rade je ale nutná identifikácia vektorov a ich populácií (Weintraub, 2007).

4. Fytoplazma proliferácie jablone (*'Candidatus Phytoplasma mali'*)

Fytoplazma proliferácie jablone patrí do 16SrX skupiny, tzv. AP skupiny (Lorenz *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1998b; Lee *et al.*, 2000; Kison a Seemüller, 2001), ktorá zahŕňa tri hlavné druhy fytoplaziem: '*Ca. Phytoplasma mali*' 16SrX-A, vyvolávajúcu proliferáciu jablone (AP); '*Ca. Phytoplasma pyri*' 16SrX-C, vyvolávajúcu chradnutie hrušky (PD) a široko rozšírenú '*Ca. Phytoplasma prunorum*' 16SrX-B, vyvolávajúcu Európsku žltáčku kôstkovíc (ESFY) (Bertaccini, 2007; Seemüller a Schneider, 2004; Marcone *et al.*, 2010). Všetky tri fytoplazmy sú zaradené medzi karanténne a k regulácii doporučené patogény A2 zoznamu EPPO a sú prítomné vo väčšine európskych krajín (EPPO, 2015).

Proliferácia jablone bola prvýkrát popísaná v Taliansku (Rui *et al.*, 1950), pričom až v neskoršom období bola zistená jej príčina a hlavný patogén, ktorým je fytoplazma. Fytoplazma proliferácie jablone bola popísaná ako samostatný druh '*Ca. Phytoplasma mali*' v roku 2004 a v súčasnosti predstavuje jednou z ekonomicky najvýznamnejších fytoplazmových chorôb na jabloniach v Európe (Seemüller a Schneider, 2004; Seemüller *et al.*, 2011).

4.1. Genetická charakteristika a variabilita '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Z pohľadu fylogenetiky '*Ca. Phytoplasma mali*' vykazuje veľmi vysokú identitu s fytoplazmami patriacimi do AP skupiny. Hodnota identity fytoplaziem '*Ca. Phytoplasma pyri*', '*Ca. Phytoplasma prunorum*' a '*Ca. Phytoplasma mali*' sa pohybuje v rozmedzí 98,5–99 %. Fytoplazma proliferácie jablone vykazuje od blízko príbuznej fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma pyri*' rozdiel v hodnote identity v rozmedzí 1–1,1 % a od fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma prunorum*' rozdiel v hodnote identity v rozmedzí 1,3–1,5 %. Na základe ustanovenia IRPCM, že nový druh musí mať spoločnú nižšiu ako 97,5% identitu s predošlými popísanými druhmi, '*Ca. Phytoplasma mali*' v porovnaní s ESFY a PD toto kritérium nespĺňa. Fytoplazmy zo skupiny AP sú však uznané ako samostatné druhy na základe ich odlišnej biológie, pod čím sa myslí odlišný okruh ich hostiteľov ako aj odlišný okruh ich vektorov. Fytoplazmy z AP skupiny môžu byť od seba odlišené RFLP analýzami na základe ich odlišných profilov s využitím reštrikčných endonukleáz *RsaI*, *SspI*, *BsaAI* a *SfcI*. Pre fytoplazmu proliferácie jablone bola v pozícii 1393–1409 detekovaná charakteristická typová sekvencia 5'-AATACTCGAAACCAGTA-3' (Seemüller a Schneider, 2004).

Analýza genetickej variability izolátov AP fytoplazmy sa prevádza zameraním na oblasti génu mimo 16S-23S rDNA, a to amplifikáciou génov kódujúcich ribozomálne proteíny *rpl22-rps3*, v prípade proliferácie jablone s využitím primerov *rpAP15f* a *rpAP15r* (Martini *et al.*, 2008), amplifikáciou génov kódujúcich nitroreductase-like proteín s využitím primerov AP13 a AP10 (Jarausch *et al.*, 1994; 2000), následne AP14 a AP15 (Casati *et al.*, 2010). V závislosti na skupine fytoplazmy sa využívajú aj gény kódujúce už spomínané membránové proteíny, elongačné faktory, helikázy atď.

Molekulárna charakterizácia génu kódujúceho ribozomálne proteíny *rpl22-rps3* odhalila prítomnosť vyššej genetickej heterogenity v rámci izolátov '*Ca. Phytoplasma mali*' a viedla k navrhnutiu 4 podtypov: *rpX-A*, *rpX-B*, *rpX-C* a *rpX-D* (Martini *et al.*, 2008). Analýzou génu pre nitroreductase-like proteín, zloženého z troch otvorených čítacích rámcov (ORFs), bola preukázaná prítomnosť najmenej troch odlišných AP fytoplazmových podtypov označovaných ako AT-1, AT-2 a AP-15 (Jarausch *et al.*, 1994; 2000).

Rozlíšenie jednotlivých podskupín a podtypov fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma mali*' s ohľadom na ich predpokladanú virulenciu bolo dosiahnuté single-strand conformation polymorphism (SSCP) a sekvenčnými analýzami fragmentu *HflB* génu (Schneider a Seemüller, 2009).

4.2. Hostitelia '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Hlavným hosťiteľom '*Ca. Phytoplasma mali*' sú druhy rodu Jablň (*Malus* Mill.), či už divé alebo kultúrne, pričom jej najvýznamnejším hosťiteľom je Jablň domáca (*Malus domestica*, Borkh.). Ako jej ďalší hostitelia boli identifikovaní napr. lieskovce (*Corylus* ssp.), čerešne (*Prunus avium*), marhule (*P. armeniaca*) a slivky (*P. domestica*) (Bertaccini *et al.*, 2014). Jednotliví hostitelia sa líšia svojou vnímavosťou k patogénovi ako aj prejavovanými symptómami a ich intenzitou v odozve na infikáciu. Najtypickejšieho a najčastejšieho hosťiteľa '*Ca. Phytoplasma mali*' predstavuje spomedzi jabloní odroda 'Golden Delicious', ktorá sa ako vnímavý hosťiteľ využíva podľa odporúčenia EPPO k testovaniu fytoplazmy jablone. Mimo 'Golden Delicious' existuje ešte veľa ďalších odrôd jabloní, ktoré sú na prítomnosť fytoplazmy citlivejšie. Jedinou doposiaľ zistenou výnimkou je pomerne odolný japonský druh Jablň Sieboldova (*Malus sieboldi* (Regel) Rehd.) (Kartte a Seemüller, 1991; Schlesingerová, 2011).

Fytoplazmy ovocných stromov sú šírené rastlinným materiálom pri propagácii infikovaných štepov alebo koreňov (Kartte a Seemüller, 1991), kontaktom koreňmi medzi

rastlinami (Ciccotti *et al.*, 2007), pomocou očkovania, štiepaním, hľuzami, koreňovým zrastami a iné. U AP fytoplazmy nebol preukázaný prenos semenami alebo mechanickou inokuláciou.

Symptómy infekcie ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

U hostiteľských rastlín fytoplazmy proliferácie jablone pozorujeme symptomatické a asymptomatické stromy. U symptomatických rastlín môžeme pozorovať charakteristické metličkovité vetvenie rastliny, tvorbu ružíc listov, ktoré vyrastajú na vrcholoch vetiev (je to dôsledok rastu dormantných púčikov v lete). Ružice pozostávajú z malých listov alebo dlhších palistov rastúcich vo veľmi šikmom uhle. Za ďalšie prejavy infekcie fytoplazmou môžeme považovať menšie počty kvetov a ich sfarbenie, kedy sa vytvárajú zelené lupienky listového charakteru namiesto bielych okvetných listov. Úroda nedosahuje ani 50 % z pôvodnej úrody. Plody sú menšie, nedostatočne vyfarbené a majú nevýraznú chuť. Abnormality v raste sa prejavujú aj na koreňoch, ktorých počet je síce oproti normálnemu stavu zvýšený, na druhej strane korene nedosahujú očakávanú hrúbku. Takéto korene potom vytvárajú veľkú zauzlenú sieť a vzájomne si prekážajú. Sprievodným znakom napadnutia proliferáciou jablone je zvýšená citlivosť k napadnutiu múčnatkou jabloní (*Podosphaera leucotricha*) (EPPO, 1997).

Vzhľadom na každoročnú redistribúciu fytoplazmy v rastline po zimnom období sa všetky tieto symptómy z roka na rok menia, a takisto sa nevyskytujú na tých istých vetvách každý rok (Blumer a Bovey, 1957; Bovey, 1963; 1972; Schuch, 1962).

Symptómy proliferácie jablone sa nemusia vždy prejavíť na celej rastline, v prípade latentnej infekcie sa neprejavujú vôbec. Mnohé stromy vykazujú symptómy iba počas prvých troch rokov po napadnutí, potom u nich príznaky vymiznú. U mnohých bezsymptómových stromov bola preukázaná už spomínaná latentná infekcia. Takéto stromy môžu byť skrytým zdrojom infekcie a ich skorá detekcia a následné odstránenie je rovnako dôležité ako intenzívna kontrola vektorov (Ambroziè Turk *et al.*, 2008; Lešnik *et al.*, 2007; Mehle *et al.*, 2010).

V prípade niektorých infikovaných stromov bol pozorovaný jav nazývaný ‘recovery’, stav pripomínajúci ozdravenie. Tieto stromy v dlhšom období nevykazovali žiadne alebo len mierne symptómy infekcie. Ani tento stav však nie je zárukou, že sa vážne symptómy znovu neobjavia. Rozvoj symptómov výrazne závisí na virulencii infikujúceho AP fytoplazmového kmeňa (Seemüller a Schneider, 2007). Prejavy príznakov a ich intenzita nie sú rovnaké ani u materskej rastliny a rastliny z nej vypestovanej. Z materiálov

odobratých z infikovaných, ale bezpríznakových materských rastlín môžu vyrásť rastliny so silným prejavom symptómov a naopak. Práve preto nemôže byť bezpríznakovosť napadnutých rastlín automaticky považovaná za prejav prítomnosti mierneho kmeňa fytoplazmy (Schlesingerová, 2011). Súčasne môžu byť stromy infikované viacerými kmeňmi fytoplazmy proliferácie jablone (Seemüller *et al.*, 2010; Seemüller a Schneider, 2007).

Interakcie hostiteľ - 'Candidatus Phytoplasma mali'

Interakcia hostiteľskej rastliny a fytoplazmy 'Ca. Phytoplasma mali' bola podrobne študovaná na príklade odolnej jablone *Malus sieboldii* a vnímavaj jablone *Malus domestica*, odrody 'Golden Delicious'. Pri štúdiu rozdielov v interakcii patogéna s týmito rastlinami bolo objavené, že dochádza k rozdielnej expresii génov v odpovedi na stres a patogéna. Jedná sa o tri gény, ktoré sú zodpovedné za elektrónový transport, produkciu H₂O₂ a signalizáciu. Porovnaniami navyše preukázali, že u vnímavaj jablone *Malus domestica* dochádza k výraznej zmene v celulárnej organizácii postihnutého floémového pletiva. U *Malus sieboldii* tieto zmeny boli pozorované iba na minimálnej úrovni (Kartte a Seemüller, 1991; Musetti *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2011).

Ďalšou analýzou interakcie 'Candidatus Phytoplasma mali', jej hostiteľa, jablone (*Malus domestica*) a jej vektora *Cacopsylla picta* a *C. melanoneura* (Hemiptera, Psyllidae) bolo preukázané, že fytoplazma môže modifikovať hostiteľskú rastlinu, ktorá v reakcii na infekciu začne do prostredia uvoľňovať prchavú látku. Táto látka robí infikovanú rastlinu atraktívnejšou pre jej vektora *Cacopsylla picta*, ktorý je schopný rozlíšiť odor zdravej a infikovanej jablone, pričom preferuje infikovanú rastlinu a takto prispieva k efektívnemu šíreniu fytoplazmy v rámci hostiteľskej populácie (Gross *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2008a; 2008b; 2011). Rastlinou produkovaná látka – seskviterpén beta-caryophyllene atrahuje obe pohlavia *C. picta*, preto je zvažované jeho využitie na vývoj pascí na monitorovanie a odchyty jedincov *C. picta* (Gross a Mayer, 2010).

4.3. Vektory 'Candidatus Phytoplasma mali'

Významné fytoplazmové vektory patria do podradu Sternorrhyncha, nadčel'ade Psylloidea, rod *Cacopsylla* (Weintraub a Beanland, 2006). Fytoplazma proliferácie jablone je prenášaná propagatívnym, perzistentným spôsobom (Marzachi *et al.*, 2004).

Známe vektory 'Candidatus Phytoplasma mali' sú méry *Cacopsylla picta* (synonymum *C. costalis*) (Föerster, 1848; Frisinghelli *et al.*, 2000; Jarausch *et al.*, 2003)

a *C. melanoneura* (Föerster, 1848; Tedeschi a Alma, 2004). Mimo nich boli objavené aj iné hmyzie vektory prenosu 'Ca. Phytoplasma mali' ako je peniarka *Philaenus spumarius*, cikádka *Artianus interstitialis* (Hegab a El-Zohairy, 1986) a *Fieberiella florii* (Krczal *et al.*, 1988; Tedeschi a Alma, 2006; Mehle *et al.*, 2011).

***Cacopsylla picta* (Föerster, 1848)**

Cacopsylla picta bola popísaná v roku 1848 Föersterom. Jedinci predstavujú oligofágov rodu *Malus*, ich hostiteľmi sú Jablň domáca (*Malus domestica*) a Jablň lesná (*Malus sylvestris*) (Burckhardt, 1994; Hodkinson, 2009). *C. picta* je distribuovaná iba v Európe (Ouvrard, 2014), ako vektor fytoplazmy AP bola potvrdená v štúdiách v roku 2000 a 2003 (Frisinghelli *et al.*, 2000; Jarausch *et al.*, 2003). Ako vektor fytoplazmy proliferácie jablone je táto méra potvrdená v severovýchodnom Taliansku (Tedeschi *et al.*, 2002; Frisinghelli *et al.*, 2000), Nemecku (Jarausch *et al.*, 2003; Carraro *et al.*, 2008), severnom Francúzsku (Alsace) a severnom Švajčiarsku (Aargau, Solothurn) (Jarausch *et al.*, 2011), Fínsku (Lemmetty *et al.*, 2011; 2013), Poľsku (Ciešliška a Kruczyńska, 2011; Ciešliška *et al.*, 2012), Španielsku, Rakúsku a Baskicku (Lavina *et al.*, 2011).

Životný cyklus méry *C. picta* je podobný ako u méry *Cacopsylla melanoneura*. Hmyz dokončí jednu generáciu za rok a ako dospelec hybernuje na ihličnanoch (Mayer a Gross, 2007; Mattedi *et al.*, 2008; Čermák a Lauterer, 2008). Jarná migrácia mér z ihličnanov na hostiteľské rastliny začína v marci, dosiahne maxima v prvej polovičke apríla a dokončí cyklus v priebehu 5 týždňov. Méry najprv migrujú na trnky a hlohy, až následne sa presúvajú na jablone, kde nakladú vajíčka. Vývin lariev trvá 4 až 5 týždňov, pričom nové imága zotrvávajú v sadoch ešte približne 2 týždne. Migrácia nových generácií mér z hostiteľských rastlín späť na ihličnany sa odohráva cca. na konci júna (Jarausch *et al.*, 2003; Mattedi *et al.*, 2008; Tedeschi *et al.*, 2002; 2009). Predpokladá sa, že migrácia mér na ihličnany prebieha spôsobom, kedy jedince *C. picta* sú pasívne prenesené v teplých letných dňoch stúpajúcimi vzdušnými prúdmi. Tieto prúdy vystupujú z nerovnomerne rozohriateho zemského povrchu do vyšších oblastí, desiatky kilometrov preč od hostiteľských rastlín v nížinách. Keď prúdy dosiahnu vrchy, stratia svoju unášaciu schopnosť. Jedinci mér následne aktívne vyhľadávajú vhodný ihličnatý strom na prezimovanie. V Českej republike prezimávajú prednostne na smreku v nadmorských výškach 500 m. n. m. a vyššie. Takéto vzdušné prúdy vhodné pre pasívnu migráciu mér vystupujú iba v dlho-dennej perióde (jún - august) medzi 11 ráno a 4 až 5 hodinou večer. V tejto perióde južné a juhovýchodné vetry prevládajú v danej oblasti a predeterminujú

migračnú dráhu mér. Stúpajúce vetry nevystupujú v krátko-denných periódach, a preto tie druhy mér, v ktorých sa dospelci novej generácie objavia príliš skoro (apríl – máj) alebo príliš neskoro (september – november) môžu migrovať len na krátke vzdialenosti (Čermák a Lauterer, 2008).

‘*Ca. Phytoplasma mali*’ sa vo vektore *C. picta* multiplikuje veľmi rýchlo, takže noví jedinci sa stávajú infekčnými v rámci 2 týždňov a sú schopní prenášať chorobu vnútri sadu v tej istej sezónne, čo indikuje polycyklický patosystém s dvoma hlavnými transmisnými periódami (Jarausch *et al.*, 2011). Fytoplazmu navyše vektory prenášajú po celý život, perzistentne (Carraro *et al.*, 2008; Jarausch *et al.*, 2003; 2004).

Monitoring jedincov mér *C. picta* sa môže prevádzať pomocou žltých lepových dosiek, ktoré sa vyvešujú do korún stromov, približne vo výške 1,5–2 m nad zemou. Vešajú sa diagonálne každých 20 m smerom od okraja ku stredu sadu. Aplikácia dosiek prebieha od začiatku doby náletu až po obdobie spätnej migrácie mér na zimoviská, pričom dosky sa aplikujú v týždňových intervaloch. Ďalším spôsobom je odchyt do sieťky a sklepanie. V sade sa zvyčajne vyskytujú viaceré druhy *Cacopsylla*, preto je pri hodnotení dôležitá ich správna determinácia (Tedeschi *et al.*, 2002; Galetto *et al.*, 2005; Fialová *et al.*, 2008; Tedeschi *et al.*, 2009; Casati *et al.*, 2010).

Pri štúdiách, ktoré prebiehali v rokoch 2002–2009 v sadoch v Nemecku, severnom Švajčiarsku a východnom Francúzsku, bolo zistené, že obe pohlavia *C. picta* sú približne rovnako infekčné, avšak viac bolo odchytených samičiek. Celkový pomer samec : samica bol 1:1,5. Fytoplazmu proliferácie jablone úspešne prenášajú ako dospelce, tak aj nové jedince. Účinnosť prenosu sa pohybovala medzi sledovanými rokmi v rozmedzí 8 až 45 % pre prezimujúce jedince a od 2 do 20 % pre jedince z novej generácie. Predpokladá sa istá korelácia medzi úrovňou infekčnosti *C. picta* a infekčnosťou v sade napadnutom ‘*Ca. Phytoplasma mali*’. Titer fytoplazmy v jedincoch odchytených už druhý deň po prvom nálete do sadu bol rovnako vysoký ako u jedincov testovaných po 6 týždňoch. To znamená, že prezimujúce jedince prišli do sadu s vysokou koncentráciou fytoplazmy v sebe, a že fytoplazma sa v hmyze multiplikuje počas celej periódy, ktorú strávi na zimovisku (Jarausch *et al.*, 2011). Odhliadnuc od značne nerovnomernej populačnej hustoty, je v odlišných regiónoch podobná populačná dynamika mér a zároveň je vo všeobecnej zhode vzhľadom k životnému cyklu *C. picta* v týchto regiónoch (Mattedi *et al.*, 2008). Jarausch *et al.* (2011) navyše zistili, že typ režimu pestovania jabloní nemá v skutočnosti vplyv na frekvenciu výskytu vektora. Iba pestovateľské postupy zahrňujúce intenzívne postrekovanie viedli v niektorých sadoch k redukcii veľkosti populácie vektora.

Problémom však je, že mnohé postreky začínajú byť aplikované až po začiatku remigrácie mér do sadov, kedy už na vektora nemajú žiaduci účinok.

O zmesných infekciách mér *C. picta* viacerými rôznymi podskupinami 'Ca. Phytoplasma mali' existuje minimum informácií. Ermacora *et al.* (2007) preukázali, že jedinec *C. picta* bol infikovaný zmesou fytoplaziem podskupín rpX-A a rpX-D pri saní z hostiteľskej rastliny, ktorá niesla tú istú zmesnú infekciu. Jednalo sa však iba o jedného jedinca z 20 testovaných, ďalšie štúdiá neboli prevedené.

***Cacopsylla melanoneura* (Föerster, 1848)**

Cacopsylla melanoneura bola popísaná v roku 1848 Försterom. Ako vektor fytoplazmy AP bola potvrdená v štúdiách v roku 2002 (Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi a Alma, 2004). Jedinci sú schopní prenášať rôzne typy fytoplaziem zo skupiny 16Sr (Seemüller, 2002). V minulosti bola *C. melanoneura* považovaná za oligofága pre hostiteľov patriacich do rodu *Crataegus* a za jej hlavného hostiteľa bol považovaný hloh (*Crataegus monogyna* Jacq.) (Tedeschi *et al.*, 2009). V súčasnosti je preukázané, že jej hostiteľmi sú tiež jablone (*Malus spp.*) a príležitostne ďalšie rody z čeľade ružovité, ako sú napríklad hrušky (*Pyrus spp.*) alebo mišpuľa (*Mespilus germanica* L.) (Lauterer, 1999). Bolo potvrdené, že *C. melanoneura* je schopná vnímať a orientovať sa medzi odlišnými hostiteľskými odormi (Gross a Mekonen, 2005; Mayer a Gross, 2007). Ako vektor fytoplazmy proliferácie jablone je méra *C. melanoneura* potvrdená v severozápadnom Taliansku (Aosta Valley) (Tedeschi *et al.*, 2002), Fínsku (Lemmetty *et al.*, 2011; 2013), Poľsku (Cieślińska a Kruczyńska, 2011; Cieślińska *et al.*, 2012), Španielsku, Rakúsku a Baskicku (Lavina *et al.*, 2011).

Životný cyklus méry *C. melanoneura* je podobný ako u méry *Cacopsylla picta* (viď vyššie). Rozdiel je v tom, že *C. melanoneura* migruje na ihličnany na konci mája (prv ako *C. picta*). Na hostiteľské rastliny sa po prezimovaní vracia v období, kedy maximálna teplota po dobu 7 dní dosahuje úroveň nad 9,5 °C (Tedeschi *et al.*, 2012), čo väčšinou znamená, že remigruje koncom marca, v krajinách s teplejšími klimatickými podmienkami môže remigrovať aj prv. Prvé jedince novej generácie sa objavujú na začiatku mája. Zatiaľ čo nové jedince z jabloní aj hlohu migrujú spoločne, dospelce sa na hlohu vyskytujú o niekoľko týždňov dlhšie v porovnaní s jedincami prítomnými na jabloniach. Zároveň sa jedince mér vyskytujú na hlohu vo vyššom počte. Z toho vyplýva, že hloh predstavuje pre ne vhodnejšieho hostiteľa (Chireceanu & Fătu, 2012).

Predpokladá sa, že nové jedince *C. melanoneura* migrujú približne týždeň po vyliahnutí a to najprv na ihličnany v nížinách, kde zotrávajú pár dní. Následne ich opúšťajú a migrujú na ihličnany vo vrchoch. Remigrácia je obdobná, najprv sa jedince z vysokohorských oblastí presúvajú na prechodné hostiteľské rastliny, ktoré predstavujú ihličnany v nížinách až následne sa presúvajú na hlohy a jablone, kde kladú vajčka (Mayer a Gross, 2007).

Odchyt jedincov *C. melanoneura* je obdobný ako v prípade mér *C. picta*.

Méry *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura* ako vektory AP fytoplazmy sa líšia v rámci rozličných geografických oblastí ich distribúciou, prirodzenou úrovňou infekčnosti a kapacitou prenosu. Navyše sa odlišuje aj infekčnosť jednotlivých generácií, či už prezimujúcich alebo nových jarných generácií. (Jarausch *et al.*, 2007).

Hoci je vzťah medzi fytoplazmami, ich hostiteľmi a vektormi vysoko špecifický, vyskytujú sa určité interakcie a biologické faktory, ktoré ovplyvňujú epidemiológiu choroby a ekológiu vektorov, čím značne sťažujú všeobecné štúdiá a na nich založené opatrenia. Variabilita populácií mér medzi jednotlivými regiónmi alebo krajinami, či možnosť jedného druhu *Cacopsylla* rozdeliť do dvoch poddruhov s potencionálne opačným charakterom prenosu výrazne komplikuje štúdiá a možnosť všeobecného zhodnotenia infekčnosti vektorov. Z variability medzi populáciami vyplýva, že jednotlivé populácie môžu prenášať rôzne fytoplazmové kmene alebo podtypy. (Jarausch a Torres, 2014).

***Artianus interstitialis* (Germar, 1821)**

Cikádka (*Artianus interstitialis*) bola popísaná v roku 1821 Germarom. Ako vektor fytoplazmy AP bola potvrdená v experimentoch prevádzaných v Egypte. Cikádka bola schopná prenášať fytoplazmu proliferácie jablone z infikovanej rastliny zeleru na semenáče jabloní alebo na zdravú rastlinu zeleru. Prenosu boli schopné len dospelé jedince, pričom raz infikovaný jedinec prenášal fytoplazmu až do konca svojho života. (Hegab a El-Zohairy, 1986).

***Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758)**

Peniarka obyčajná (*Philaenus spumarius*) bola popísaná v roku 1758 Linnéom. Ako vektor fytoplazmy AP bola potvrdená v rovnakých experimentoch ako *Artianus interstitialis*, pričom pre obe platia rovnaké podmienky prenosu (viď vyššie) (Hegab

a El-Zohairy, 1986). Peniarka je rozšírená v Európe a Severnej Amerike. Jedná sa o polyfága so širokým okruhom rastlinných hostiteľov (Weaver a King, 1954; Lavigne, 1959). Kŕmi sa na rozličných druhoch rastlín, najmä na d'ateline a lucerne. Najdôležitejším klimatickým faktorom pre jej rozšírenie je vlhkosť prostredia (Weaver a King, 1954), pričom preferuje oblasti s dostatočnými zásobami vody. Pri saní na rastlinách sa peniarka môže infikovať rôznymi rastlinnými patogénmi, medzi ktorých patrí okrem fytoplazmy proliferácie jablone aj vírus 'Pierce's disease' alebo vírus žltacky broskyne (Delong a Severin, 1950; Mundinger, 1946). Okrem prenosu patogénov môžu peniarky priamo poškodiť rastliny pri saní a spôsobiť tak výrazné zníženie úrody (Horsfield, 1978).

***Fiebertella florii* (Stål, 1864)**

Fiebertella florii bola popísaná v roku 1864 Stálom. Na konci 80-tych rokov v Severnej Amerike bola označená za jedného z najvýznamnejších vektorov fytoplazmy 'X-disease' a potencionalneho vektora fytoplaziem zo skupiny 16Sr-X (Gold a Silvester, 1982; Krczal *et al.*, 1988; Van Steenwyk *et al.*, 1990). Ako vektor fytoplazmy ovocných stromov bola potvrdená najprv v experimentoch v Nemecku (Krczal *et al.*, 1988), pričom získané výsledky neboli po dlhé obdobie overované. Tieto zistenia boli potvrdené až v roku 2006 aj v Európe keď preukázali, že *Fiebertella florii* úspešne prenášala fytoplazmu proliferácie jablone. Kapacita prenosu AP fytoplazmy vektorom *Fiebertella florii* bola nižšia v porovnaní s mériou *C. melanoneura* a aj pri početnejších populáciách *Fiebertella florii* bolo riziko inokulácie nižšie v porovnaní s mériami (Tedeschi a Alma 2006). Je však problematické porovnávať význam týchto dvoch vektorov, keďže *Fiebertella florii* sa vyskytuje v sadoch v období po odchode mér na zimoviská. Jej najvyšší výskyt v sadoch v severozápadnom Taliansku bol zaznamenaný v období od septembra do októbra (Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002). *Fiebertella florii* predstavuje polyfága, ktorého hostiteľské rastliny patria prevažne do čeľade ružovité. Predstavuje tak vektora, ktorý môže šíriť fytoplazmy medzi viacerými hostiteľskými druhmi (Lee *et al.*, 2000; Swenson, 1974; Tedeschi a Alma 2006).

4.4. Rozšírenie a variabilita '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Fytoplazma proliferácia jablone (AP) a jej vektory boli pôvodne limitované v Európe a Palearktiskej zóne (Jarausch a Jarausch, 2010). Systematický prieskum ukázal, že AP bola detekovaná vo väčšine krajín Európskej únie, kde sa komerčne pestujú jablone (MacLeod *et al.*, 2012). Záznamy pochádzajú z väčšiny západných, južných a centrálnych

EU krajín. Mimo EU bola AP objavená v Balkánskych štátoch (Albánsko, Bosna a Hercegovina, Chorvátsko, Srbsko), Turecko, Moldavsko, Švajčiarsko a Ukrajina. Severným limitom výskytu a distribúcie je Nórsko (MacLeod *et al.*, 2012). ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ je na zozname škodlivých organizmov aj v ďalších krajinách ako Čile, Kolumbia, Peru, USA, Kanada alebo Japonsko (USDA, 2012). Prehľad výskytu fytoplazmy proliferácie jablone potvrdený v jednotlivých krajinách vid’ tabuľka 1.

Tabuľka 1: Distribúcia fytoplazmy proliferácie jablone vo svete (podľa: USDA, 2012)

Kontinent	Krajina	Referencie
Ázia	Turecko	CABI (2011)
Afrika	Tunisko	Ben Khalifa a Fakhfakh, 2011
Európa	Albánsko	Myrta <i>et al.</i> , 2003
	Rakúsko	Németh, 1986
	Belgicko	Németh, 1986
	Bulharsko	Németh, 1986
	Chorvátsko	CABI (2011)
	Česká republika	Bertaccini <i>et al.</i> , 1997
	Francúzsko	Jarausch <i>et al.</i> , 1994
	Nemecko	Lorenz <i>et al.</i> , 1995; Seemüller <i>et al.</i> , 1998a
	Grécko	Németh, 1986
	Maďarsko	Del Serrone <i>et al.</i> , 1998
	Taliansko	Firrao <i>et al.</i> , 1993, Osler <i>et al.</i> , 2001
	Moldavsko	CABI (2011)
	Nórsko	Németh, 1986
	Poľsko	CABI (2011)
	Rumunsko	Németh, 1986
	Srbsko a Čierna Hora	Németh, 1986
	Slovensko	CABI (2011)
	Slovinsko	Osler <i>et al.</i> , 2001
	Španielsko	Avinent a Liácer, 1995
	Švajčiarsko	Németh, 1986
Ukrajina	CABI (2011)	

Bola potvrdená prítomnosť rôznych ribozomálnych podtypov a podskupín fytoplazmy proliferácie jablone v testovaných infikovaných jabloniach, avšak ‘*Ca. Phytoplasma mali*’, ribozomálna podskupina 16SrX-A sa vyskytuje najčastejšie (Seemüller a Schneider 2004). V prípadoch výskytu fytoplazmy naprieč celou Európou sa vyskytujú aj prípady zmesných infekcií a nedávne práce tiež naznačujú, že zmesné infekcie majú patologický význam, pravdepodobne kvôli antagonistickým kmeňovým interakciám vedúcim k posunom v štruktúre populácií, ktorá môže viesť k jej nezvyčajnej symptomatológii AP (Seemüller *et al.*, 2010). Pri výskumoch sa zistilo, že pri takmer všetkých zmesných infekciách išlo o zmes príznakovo slabých a silne virulentných kmeňov. Skoršie pozorovania s fytoplazmou žltacky astier (Freitag, 1964; Kunkel, 1955) naznačujú, že fytoplazmové zmesné infekcie a kmeňové interakcie nie sú obmedzené na ‘*Ca. Phytoplasma mali*’, ale sú pravdepodobne široko rozšíreným fenoménom v fytoplazmológii (Seemüller *et al.*, 2011).

4.5. Ekonomický dopad ochorení spôsobených ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

Fytoplazma proliferácie jablone je prítomná takmer vo všetkých európskych krajinách a jej hlavný dopad na kultivary jabloní (*Malus domestica*, Borkh.) je produkcia malého a nepredajného ovocia. Spôsobuje zmenšenie veľkosti ovocia približne o 50 %, redukcii váhy približne o 63–74 % a to všetko vedie k všeobecnému zníženiu kvality ovocia (EPPO/CABI, 1996). Efektívna kontrola mér v jablčných sadoch závisí na perfektnom nastavení rozvrhov ošetrovania sadov jabloní, zobratí v úvahu stupňa účinnosti alebo preferenciu nízko-dopadových insekticídov, využití alternatívnych produktov (napr. kaolín, hydrogén uhličitán draselný a minerálne oleje) alebo vysadením predátorov mér (Belien *et al.*, 2013).

5. '*Candidatus Phytoplasma mali*' v Českej republike

Pestovanie jabloní je dôležitou súčasťou produkcie ovocia v Českej republike a preto predstavuje fytoplasma proliferácie jablone potencionálne závažný problém aj v tejto krajine. Štúdium fytoplazmy v Českej republike sa v súčasnosti zameriava ako na samotnú fytoplazmu, tak aj na jej vektorov (Fialová *et al.*, 2003; Navrátil *et al.*, 1998).

Jablone s charakteristickými príznakmi proliferácie jablone boli v Českej republike zaznamenávané od počiatku sedemdesiatych rokov dvadsiateho storočia. Infikované jablone sa vyskytovali prevažne v husto nasadených sadoch a bol u nich pozorovaný 47% pokles úrody, znižovanie váhy jednotlivých plodov v priemere o 59 % a pokles obsahu cukrov v plodoch o 29 %. Plody týchto jabloní boli menej vyfarbené, neopadali prirodzene v júni (pretrvávali na strome) a pri podrobnejšom štúdiu sa zistilo, že v týchto plodoch dochádza vplyvom infekcie k nerovnováhe v pomere obsahu cukrov a kyselín. Na základe charakteristických symptómov infikovaných jabloní sa predpokladala asociácia proliferácie s vírusmi spôsobujúcimi metlovitosť rastlín, napr. podskupinou vírusov '*acarpia*' (Blatný *et al.*, 1963; Blatný a Blatný, 1960). Podporenie teórie, že sa jedná o bakteriálny organizmus, priniesli štúdie dokazujúce náchylnosť patogéna spôsobujúceho proliferáciu jablone k tetracyklínovým antibiotikám. Pri ošetrovaní infikovaných stromov týmito antibiotikami došlo k potlačeniu viditeľných symptómov (Seidl a Komárková, 1972). Už v tejto dobe sa predpokladalo, že niektoré odrody jabloní predstavujú latentných prenášačov ochorenia. Pokusy zamerané na prenos infekcie mechanickou alebo semi-mechanickou cestou nemali veľký úspech, preto sa autori začali domnievať, že k ich výraznému šíreniu prispievajú pravdepodobne najmä vektory (Blatný a Blatný, 1960).

Proliferácia jablone bola postupne potvrdená v stredných a južných Čechách, v nížinách strednej a južnej Moravy a na západnom a východnom Slovensku (Blatný a Blatný, 1960). K jej významnému šíreniu dochádzalo najmä v sedemdesiatych rokoch výsadbovým materiálom a prostredníctvom štiepenia. Z tohto dôvodu bolo v záujme poľnohospodárov zavedenie kontroly a dôsledných selekcií, čím by sa výskyt fytoplazmou spôsobených ochorení znížil. Po zavedení fytosanitárnej regulácie pre v roku 1977 na území bývalého Československa (a Českej republiky) bola fytoplasma proliferácie jablone po dlhé obdobie (1965–1995) eliminovaná z nových sadov obzvlášť introdukciou zdravého propagačného materiálu v záhradníckej praxi. Po určitom období sa však na území Českej republiky znova začali objavovať lokálne epidémie (Blažek *et al.*, 2005; Fialová *et al.*, 2003; Fránová *et al.*, 2008; Kučerová *et al.*, 2005; Navrátil *et al.*, 1998), pričom tento

zvýšený výskyt bolo pozorovaný najmä v starších, zanedbávaných výsadbách, ktoré predstavovali dlhodobý zdroj infekcie a odkiaľ sa infekcia mohla neustále šíriť do produkčných výsadiet (Schlesingerová, 2011).

Prvá snaha o komplexný aktuálny prieskum výskytu fytoplaziem ovocných stromov v Českej republike pochádza z konca dvadsiateho storočia. Dovtedy publikované údaje týkajúce sa výskytu fytoplazmy v Českej republike boli podložené len subjektívnymi hodnoteniami externých symptómov, ktoré vykazovali pozorované rastliny. Tieto novšie štúdiá boli založené na metóde PCR. Výskyt fytoplazmy proliferácie jablone bol s využitím tejto metódy potvrdený v oblastiach: Holovousy, Hořice, Tichobuzice, Zdice, Vranov, Krtely, Temelín a Třisov (Navrátil *et al.*, 1998).

Počas niekoľkoročných štúdií výskytu choroby proliferácie jablone v Českej republike bolo preukázané, že skoré odstraňovanie infikovaných stromov vykazujúcich symptómy neovplyvnilo výrazne jej šírenie. Pravdepodobnou príčinou bolo, že fytoplazmou postihnuté stromy začnú vykazovať symptómy až v období vlastnej infekčnosti, teda v období, kedy už predstavujú zdroje AP fytoplazmy pre ďalšie hostiteľské rastliny. Významnejší vplyv mala aplikácia insekticidu, ktorá viedla k zníženiu výskytu vektorov predstavujúcich jej rezervoáre. Bolo to ďalšie potvrdenie významu vektorov ako dôležitých faktorov pre šírenie AP fytoplazmy. Mimo spomínaných faktorov závisí úroveň fytoplazmovej infekcie v sadoch aj na iných podmienkach, ako je napríklad: (1) infekčnosť ostatných stromov v sade (čím vyšší je počet infekčných stromov v danej lokalite, tým sa dá očakávať vyšší počet infikovaných stromov v nasledujúcom roku); (2) vzdialenosť od zdroja infekcie (problém najmä v hustých sadoch); (3) vek stromov (najčastejších hostiteľov predstavovali 10-ročné stromy); (4) štiepenie stromov a (5) sadba odlišných odrôd jabloní (Blažek *et al.*, 2005).

5.1. Výskyt '*Candidatus Phytoplasma mali*' v Českej republike

Medzi rokmi 1999–2002 bol v Českej republike u mnohých jabloní zo súkromných záhrad preukázaný RFLP analýzami výskyt AP fytoplazmy – podskupina 16SrX-A. Väčšina z nich navyše nevykazovala príznaky, čo znamenalo prítomnosť latentnej formy infekcie. Zvýšenie incidencie AP fytoplazmy v ďalšom období bolo následkom zvyšovania počtu 'nízko-intenzívnych sadov' a sadov s organickou produkciou v rozhodujúcich oblastiach pestovania jabloní (Fialová *et al.*, 2003). RFLP analýzy génu pre 16S-23S rRNA fytoplazmy proliferácie jablone v Českej republike potvrdili prítomnosť profilov P-I, P-II a "1", "2". Najčastejší bol výskyt profilu P-I a "2", pričom bol potvrdený aj malý

výskyt zmesných infekcií P-I+P-II. Vo väčšine stromov bola prítomná fytoplazma patriaca do podskupiny rpX-A, sporadicky sa vyskytovala rpX-B. Testované fytoplazmy patrili k podtypom AP15 a AT-2. Oba spomínané podtypy mali približne rovnaký výskyt v testovaných jabloniach, len zriedka sa vyskytoval podtyp AT-1 a zmes dvoch alebo všetkých troch AP podtypov. Zmesné infekcie sa častejšie vyskytovali v starých sadoch bez starostlivosti, ktoré nie sú chránené voči vektorom (Fránová *et al.*, 2011; 2013).

5.2. Výskyt vektora '*Candidatus Phytoplasma mali*' v Českej republike

Prvým známym potvrdeným vektorom proliferácie jablone v Českej republike bola peniarka (*Philaenus spumarius*), kapacita jej prenosu bola však na nízkej úrovni (Seidl, 1980). Predmetom súčasného štúdia vektorov so zameraním na prenos proliferácie jablone v Českej republike sú predovšetkým méry *Cacopsylla picta* a *C. melanoneura* prípadne *C. mali*. Prítomnosť všetkých týchto mér v Českej republike bola potvrdená v roku 1999 (Lauterer, 1999). Pri štúdiu prezimujúcich mér na ihličnanoch v dvoch vrchovinových oblastiach v Českej republike, južná Morava Dražanská vrchovina a Pavlovské vrchy, bol odchytený značne vyšší počet mér *C. melanoneura*, než *C. picta* (približne o 63 %). Jedince *C. picta* pritom na prezimovanie uprednostňovali smrek pred borovicou (Čermák a Lauterer, 2008). Molekulárnymi analýzami bola v Českej republike u oboch mér *C. picta* a *C. melanoneura* detekovaná prítomnosť fytoplazmy proliferácie jablone, na základe čoho sa začali považovať za jej potencionálne rezervoáre a vektory v regiónoch, kde sa pestujú jablone. (Fialová *et al.*, 2008). Výskum a monitorovanie druhov mér v štyroch sadoch jabloní s odlišným režimom pestovania (konvenčným, organickým, integrovaným režimom a v neudržiavanom sade) preukázal odlišnosti ako medzi jednotlivými sadmi tak aj medzi rokmi. Najviac jedincov mér bolo odchytených v sade v organickom režime pestovania a opustenom sade. Podstatne menej jedincov bolo odchytených v sade s konvenčným režimom pestovania (približne 5x menej) a najmenej v sade v integrovanom režime pestovania (10x menej ako v sade v organickom režime pestovania). Pozitívne jedince na fytoplazmu proliferácie jablone boli prítomné vo veľmi nízkom počte (Ludvíková *et al.*, 2011). Naopak pri štúdiu prezimujúcich mér *C. pruni* a *C. picta* v Českej republike bola potvrdená prítomnosť '*Ca. Phytoplasma mali*' u 23 % testovaných jedincov, čo predstavuje vysokú infekčnosť vektorov (Fránová *et al.*, 2014).

Medzi rokmi 2012 a 2014 boli prevádzané štúdia zamerané na hodnotenie rizika šírenia fytoplazmy proliferácie jablone vo výsadbách jabloní v priebehu konverzie zo systému pestovania jabloní v režime integrovanej ochrany rastlín do režimu organickej produkcie.

Zistilo sa, že pri vylúčení širokospektrálnych insekticídov dochádza k zvýšeniu rizika výskytu škodcov a nárastu počtu potenciálnych prenášačov. Jedná sa o prechodné obdobie, ktoré sa po ustálení rovnováhy v novom režime opätovne zníži (Suchá *et al.*, 2015).

6. Materiál a metódy

6.1. Biologický materiál

V rámci experimentálnej časti bakalárskej práce bolo otestovaných celkovo 211 vzoriek mér *Cacopsylla picta*, vektorov fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali'. Vzorky boli získané pravidelnými odchytní počas rokov 2014 a 2015. Odchyty mér boli vykonané pomocou lepových dosiek v lokalite Bouzov-Kozov v dvoch sadoch: v sade v integrovanom režime pestovania (ďalej produkčný – PROD) a v sade v štádiu prechodu do organického režimu pestovania (ďalej EKO). Počet odchytených jedincov aj s uvedeným miestom odchytní a dátumom je uvedený v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Počty odchytených jedincov *Cacopsylla picta* za konkrétne obdobie v rokoch 2014 a 2015.

Odchyt	Obdobie	Počet mér <i>C. picta</i> v EKO sade	Počet mér <i>C. picta</i> v PROD sade
2014	28.2.-14.3.	3	1
	14.3.-24.3.	5	6
	24.3.-2.4.	16	4
	2.4.-15.4.	50	17
	15.4.-28.4.	15	1
	28.4.-14.5.	7	0
	Celkovo	96	29
2015	13.3.-27.3.	1	1
	27.3.-9.4.	2	0
	9.4.-23.4.	33	14
	23.4.-6.5.	20	9
	6.5.-21.5.	5	1
	Celkovo	61	25

Po každom odchyte bol hmyz zachytený na lepových doskách roztriedený entomológom a jedince druhu *Cacopsylla picta* boli po identifikácii a určení pohlavia uschované v 96% etanole a uskladnené pri teplote -20 °C v mrazničke, kde zostali do doby, kým boli spracované. Zo vzoriek bola následne vyizolovaná DNA.

Všetky jedince *Cacopsylla picta* boli testované na prítomnosť fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali' spôsobujúcej proliferáciu jablone.

6.2. Izolácia DNA

Celková DNA bola z hmyzu izolovaná pomocou kitu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, 2000). Postup bol nasledovný:

- 1) Jedinec *Cacopsylla picta* bol prenesený do 1,5ml mikroskúmavky so 100 µl Nucleis lysis solution a roztrúpaný UH mikrohomogenizátorom.
- 2) Zhomogenizovaný materiál bol inkubovaný pri 65 °C po dobu 15 min v suchom kúpeli (Techne DRI-BLOCK MB-102, BIOER), po 7 min bol premiešaný a následne po dobu 5 min ponechaný pri pokojovej teplote.
- 3) Do mikroskúmavky bolo pridané 2 µl RNase solution, obsah bol premiešaný prevrátením mikroskúmviek (25x) a stočený krátkym pulzom na centrifúge (Spectrafuge Labnet 24D mikrocentrifúga C2400B, Labnet International).
- 4) Lyzát bol inkubovaný pri teplote 37 °C po dobu 15 min a 5 min pri pokojovej teplote.
- 5) K lyzátu bolo pridané 34 µl Protein Precipitation solution, vortexované pri 1600 rpm (Trepáčka MS2, IKA) po dobu 20 s a nechané 5 min na ľade.
- 6) Obsah v mikroskúmvke bol centrifugovaný 4 min pri 13000 g. Supernatant s DNA bol prenesený do mikroskúmviek, opatrne zamiešaný s 100 µl izopropanolu prevrátením mikroskúmvky 5x a ponechaný pri -20°C cez noc na vyzrážanie DNA.
- 7) Izopropanol s vyzrážanou DNA bol centrifugovaný 1 min pri 13000 g pri pokojovej teplote, supernatant bol odstránený vyliatím, k peletu bolo pridané 200 µl 70% etanolu, zamiešané prevrátením 5x, centrifugované 1 min pri 13000 g pri pokojovej teplote.
- 8) Z mikroskúmviek bol odstránený etanol a mikroskúmvka s peletom DNA bola nechaná odkvapkať sa na filtračnom papieri. Po odkvapkaní boli skúmvky vložené do DNA koncentrátora SPEEDVAC (Thermo Savant, SPD111V SpeedVac Concentrator) a vysušené pri 45 °C počas 30 min.
- 9) DNA bola rozpustená pridaním 20 µl Rehydration Solution a inkubovaná pri 65 °C počas 30 min v suchom kúpeli.
- 10) Koncentrácia vyizolovanej DNA bola zmeraná pomocou spektrofotometru (NanoDrop 1000, ThermoScientific).

6.3. Detekcia fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

Prítomnosť fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ bola založená na detekcii génu pre 16S rRNA za pomoci dvojškrobovej PCR s použitím MyTaqTM DNA Polymerase (Bioline). Prvá (‘direct’) PCR bola prevedená pomocou primerov P1 a P7 (Deng a Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), na ktorú nadväzovala druhá (‘nested’) PCR s primermi

R16F2 a R16R2 (Gundersen a Lee, 1996; Lee *et al.*, 1993a). Pracovalo sa v sterilných podmienkach v laminárnom boxe. PCR reakcie prebiehali v termocyklére BIO-RAD T100TM ThermalCycler.

Na prvú ('direct') PCR bola pripravená reakčná zmes obsahujúca primery P1 (f primer) a P7 (r primer) (zloženie vid' tabuľka 3), ktorá bola rozpipetovaná po 18 µl do 0,2ml mikroskúmaviek. Do každej skúmavky bolo pridané 2 µl z izolovanej DNA. Následne bola prevedená PCR amplifikácia, podmienky vid' tabuľka 4.

Tabuľka 3: Zloženie reakčnej zmesi pre 'direct' PCR

Reakčná zmes	Koncentrácia zásobného roztoku	Konečná koncentrácia	Pipetuj 1 test (µl)
Pufor	5x	1x	4,00
Destilovaná voda			13,40
f primer	20 pmol/µl	0,2 µM	0,20
r primer	20 pmol/µl	0,2 µM	0,20
Taq polymeráza	5 U/µl	1 U/reakcia	0,20
Celkom			18

Tabuľka 4: PCR podmienky pre 'direct' PCR

	Teplota	Čas	Počet cyklov
Predenaturácia	94 °C	2 min	1x
Denaturácia	94 °C	1 min	35x
Nasadenie primerov	55 °C	2 min	
Syntéza	72 °C	3 min	
Dosyntetizovanie	72 °C	7,5 min	1x

Pre následnú amplifikáciu cieľového fragmentu DNA boli pri druhej ('nested') PCR využité primery R16F2 (f primer) a R16R2 (r primer) (Gundersen a Lee, 1996; Lee *et al.*, 1993a). Bola pripravená reakčná zmes (zloženie vid' tabuľka 5), ktorá bola rozpipetovaná po 23 µl do mikroskúmaviek a k nej bolo pridané 2 µl 20x nariedeného P1/P7 PCR produktu. Následne bola prevedená PCR amplifikácia, podmienky PCR reakcie vid' tabuľka 6.

Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi pre 'nested' PCR

Reakčná zmes	Koncentrácia zásobného roztoku	Konečná koncentrácia	Pipetuj 1 test (μl)
Pufor	5x	1x	5,00
Destilovaná voda			17,30
f primer	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25
r primer	20 pmol/μl	0,2 μM	0,25
Taq polymeráza	5 U/μl	1 U/reakcia	0,20
Celkom			23

Tabuľka 6: PCR podmienky pre 'nested' PCR

	Teplota	Čas	Počet cyklov
Predenaturácia	94 °C	2 min	1x
Denaturácia	94 °C	1 min	35x
Nasadenie primerov	55 °C	2 min	
Syntéza	72 °C	3 min	
Dosyntetizovanie	72 °C	10 min	1x

Prítomnosť PCR produktov bola zistená využitím metódy elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle (Agarose I, AMRESCO) v 1x TAE pufre. Gél na jednu elektroforézu bol pripravený z 50 ml rozvareného zásobného roztoku, do ktorého bolo pridané 3 μl fluorescenčného farbiva GoodView (GoodView™ Nucleic Acid Stain, E. coli). Do prvej jamky gélu bolo vždy napipetované 2 μl štandardu molekulovej hmotnosti GeneRuler 100 bp Plus DNA, Ladder (Fermentas), do ďalších jamiek bolo napipetované 5 μl jednotlivých PCR produktov. Separácia bola prevedená pri 80 V po dobu 60 min. Výsledok bol vizualizovaný pomocou UV transiluminátoru a dokumentačného systému Syngene (G: BOX, Syngene).

6.4. Identifikácia fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Detekované fytoplazmy boli identifikované RFLP analýzou pomocou troch reštrikčných enzýmov *MseI* (New England Biolabs), *RsaI* (Promega) a *BfmI* (Fermentas). Ako kontrolné vzorky boli použité vzorky '*Candidatus Phytoplasma mali*' (pôvodca proliferácie jablone), '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (pôvodca Európskej žltacky kôstkovíc) a '*Candidatus Phytoplasma asteris*' (pôvodca žltacky astier).

Boli pripravené samostatné reakčné zmesi pre každú reštrikčnú endonukleázu (zloženie vid' tabuľka 7). Reakčná zmes bola rozpipetovaná po 8 μl do 0,2ml mikroskúmaviiek

a k nim bolo pridané 5 μ l analyzovaného R16F2/R16R2 PCR produktu. Zmesi boli inkubované v termocykléru (BIO-RAD T100TMThermalCycler) pri 37 °C 4 hodiny.

Tabuľka 7: Zloženie reakčnej zmesi na RFLP analýzu produktov štiepaných reštrikčnými endonukleázami

Zložka	Reakčná zmes pre reštrikčnú endonukleázu	
	<i>RsaI, MseI, AluI</i>	<i>BfmI, HincII, HpaII, FauI, Pagi</i>
	Objem pre jeden test (μ l)	
Pufor 10x	1,3	1,3
BSA (10x)	1,3	0
Destilovaná voda	5,2	6,5
Enzým	0,2	0,2

Produkty RFLP boli separované elektroforeticky v 2% agarózovom géle v prostredí 1x TAE pufru. Na vizualizáciu detekovaných produktov bolo do gélu pridané 3 μ l fluorescenčného farbiva GoodView (GoodViewTM Nucleic Acid Stain, E. coli). K produktom štiepania bolo pridané 2 μ l 0,1% brómfenolovej modrej. Do jamiek gélu bolo pipetované 5 μ l zafarbeného produktu. Pre odčítanie veľkosti fragmentov bol použitý štandard molekulej hmotnosti GeneRulerTM 100 bp Plus DNA, Ladder (Fermentas). Separácia prebehla pri 60 V po dobu 90 min. Výsledky boli vizualizované za rovnakých podmienok aké boli použité pri detekcii fytoplazmy.

Vzorky, ktoré svojim reštrikčným profilom neodpovedali kontrolnej vzorke 'Ca. Phytoplasma mali' a boli identifikované ako iná fytoplazma alebo neodpovedali fytoplazme, boli z ďalších analýz vylúčené.

6.5. Genotypizácia izolátov fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali'

Pre analýzu genetickej variability detekovaných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone boli analyzované gény pre 16S-23S rRNA, gén pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3, gén pre nitroreductase-like proteín a gén pre HflB proteázu. Jednotlivé gény boli amplifikované a následne podrobené RFLP analýze. Porovnaním získaných reštrikčných profilov RFLP analýzy s publikovanými reštrikčnými profilmi týchto génov u fytoplazmy 'Ca. Phytoplasma mali' boli identifikované ich genotypy.

6.5.1. Gén pre 16S-23S rRNA

Konzervatívna oblasť 16S-23S rDNA bola u vzoriek amplifikovaná primermi P1 a P7 (z predchádzajúceho postupu, vid' časť 6.3.). P1/P7 produkty boli následne podrobené 'nested' PCR s primermi F1 (f primer) a B6 (r primer) (Davis a Lee, 1993; Padovan *et al.*, 1995) a 'nested' PCR s primermi P1A (f primer) a P7A (r primer) (Lee *et al.*, 2004b). Príprava reakčnej zmesi bola rovnaká ako bolo uvedené v predchádzajúcej časti 6.3., podmienky PCR reakcie vid' tabuľka 8 na konci podkapitoly.

Výsledky amplifikácie boli hodnotené pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle v prostredí TAE pufru za rovnakých podmienok, aké boli použité pri detekcii fytoplazmy.

Získané P1A/P7A produkty boli analyzované pomocou reštrikčných endonukleáz *HpaII* (Fermentas) a *FauI* (New England Biolabs), F1/B6 produkty pomocou reštrikčnej endonukleázy *HpaII*. Jednotlivé profily boli identifikované v následnej elektroforéze. Produkty *FauI*-RFLP v 2% agarózovom géle a produkty *HpaII*-RFLP v 8% polyakrylamidovom géle (postup na konci podkapitoly).

6.5.2. Gén pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3

Oblasť kódujúca ribozomálne proteíny rpl22-rps3 bola amplifikovaná v PCR s kombináciou primerov AP15f (f primer) a AP15r (r primer) (Martini *et al.*, 2008).

Z pôvodnej DNA bola prevedená PCR, príprava reakčnej zmesi bola rovnaká ako v predchádzajúcom prípade, podmienky PCR amplifikácie vid' tabuľka 8.

Výsledky amplifikácie boli hodnotené pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle v prostredí TAE pufru za rovnakých podmienok, aké boli použité pri detekcii fytoplazmy.

Získané AP15f/AP15r produkty boli analyzované pomocou reštrikčnej endonukleázy *AluI* (Promega). Jednotlivé profily boli identifikované v následnej elektroforéze v 8% polyakrylamidovom géle (postup na konci podkapitoly).

6.5.3. Gén pre nitroreductase-like proteín

Oblasť kódujúca nitroreductase-like proteín bola amplifikovaná v 'direct' PCR s kombináciou primerov AP13 (f primer) a AP10 (r primer) (Jarausch *et al.*, 1994; 2000). AP13/AP10 produkty boli následne podrobené 'nested' PCR s primermi AP14 (f primer) a AP15 (r primer) (Casati *et al.*, 2010). Príprava reakčnej zmesi bola rovnaká ako v predchádzajúcom prípade, podmienky PCR amplifikácie vid' tabuľka 8.

Výsledky amplifikácie boli hodnotené pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle v prostredí TAE pufru za rovnakých podmienok, aké boli použité pri detekcii fytoplazmy.

Získané AP14/AP15 produkty boli analyzované pomocou reštrikčných endonukleáz *PagI* (Thermo Scientific) a *HincII* (Fermentas). Jednotlivé profily boli identifikované v následnej elektroforéze v 8% polyakrylamidovom géle (postup na konci podkapitoly).

6.5.4. Gén pre HflB proteázu

Oblasť génu *HflB* bola amplifikovaná primermi fHflB3-1 (f primer) a rHflB3 (r primer) (Schneider a Seemüller, 2009).

Z pôvodnej DNA bola prevedená PCR, príprava reakčnej zmesi bola rovnaká ako v predchádzajúcom prípade, podmienky PCR amplifikácie vid' tabuľka 8.

Výsledky amplifikácie boli hodnotené pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle v prostredí TAE pufru za rovnakých podmienok, aké boli použité pri detekcii fytoplazmy.

Tabuľka 8: Podmienky PCR reakcií pre jednotlivé primery

Primery	Počiatočná denaturácia	Denaturácia	Nasadenie primerov	Syntéza	Dosyntetizovanie reťazcov
F1/B6	95 °C, 2 min	94 °C, 1 min	50 °C, 2 min	72 °C, 3 min	72 °C, 10 min
		34 cyklov			
P1A/P7A	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 3 min	72 °C, 7 min
		40 cyklov			
AP15f/AP15r	95 °C, 2 min	95 °C, 1 min	55 °C, 45 s	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min
		40 cyklov			
AP13/AP10 AP14/AP15	95 °C, 2 min	95 °C, 30 s	58 °C, 30 s	72 °C, 1 min	72 °C, 7 min
		40 cyklov			
fHflB3-1/rHflB3	95 °C, 5 min	95 °C, 1 min	48 °C, 1 min	72 °C, 1 min	70 °C, 7 min
		40 cyklov			

6.5.5. Postupy pri elektroforetickej separácii a RFLP analýze PCR produktov

RFLP analýza

Bola pripravená reakčná zmes pre každú reštrikčnú endonukleázu, pričom objem odpovedal počtu štiepaných získaných PCR produktov (zloženie vid' tabuľka 7 v kapitole 6.4.). Reakčná zmes bola rozpipetovaná po 8 μ l do mikroskúmaviiek, k nej bolo pridané 5 μ l konkrétneho PCR produktu a zmes bola inkubovaná v termocykléri 4 hod pri 37 °C.

Elektroforéza v 2% agarózovom géle

Pre produkty štiepania separované v 2% agarózovom géle bol gél na jednu elektroforézu pripravený z 50 ml rozvareného zásobného roztoku (1 g agarózy do 50 ml 1x TAE pufri), do ktorého bolo pridané 3 μ l farbiva GelRed (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x in DMSO - Biotium). Do prvej jamky gélu bolo napipetované 2 μ l štandardu molekulovej hmotnosti, pričom podľa veľkosti očakávaných fragmentov bol použitý GeneRuler 100 bp DNA, Ladder (Fermentas) alebo GeneRuler 50 bp DNA, Ladder (Fermentas), do ďalších jamiek bolo napipetované 5 μ l zafarbeného produktu štiepania (farbenie: 2 μ l 0,1% brómfenolovej modrej do 13 μ l zmesi). Separácia prebiehala pri 60 V približne 90 min. Výsledok bol vizualizovaný pomocou UV transiluminátoru a dokumentačného systému Syngene (G: BOX, Syngene).

Elektroforéza v 8% polyakrylamidovom géle (PAGE)

Pre produkty štiepania separované v 8% polyakrylamidovom géle bol gél na jednu elektroforézu pripravený zmiešaním piatich zložiek: destilovaná voda, TBE pufor, Acrylamide/Bis Solution 19:1 (SERVA), TEMED (N,N,N',N'-tetrametylétylendiamin, Micro Applichem) a 10 % amónium persulfát (SERVA), (v tomto poradí, zloženie vid' tabuľka 9) a ihneď po namiešaní bol prepipetovaný do komôrky na vertikálnu PAGE elektroforézu (Mini PROTEAN Tetra System, BIO-RAD). Do prvej jamky gélu bolo napipetované 2 μ l štandardu molekulovej hmotnosti, pričom podľa veľkosti očakávaných fragmentov bol použitý GeneRuler 100 bp DNA, Ladder (Fermentas) alebo GeneRuler 50 bp DNA, Ladder (Fermentas), do ďalších jamiek bolo napipetované 5 μ l zafarbeného produktu štiepania (farbenie: 2 μ l 0,1% brómfenolovej modrej do 13 μ l zmesi). Separácia prebiehala pri 20 A a 70 V približne 90 min. Gél bol po separácii fragmentov farbený 45 min v GelRed (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x in DMSO - Biotium) na trepačke (riedenie 1:3,300 v destilovanej vode). Výsledky boli vizualizované pomocou UV transiluminátoru a dokumentačného systému Syngene (G: BOX, Syngene).

Tabuľka 9: Zloženie 8% polyakrylamidového gélu

	Destilovaná voda	5x TBE pufor	19:1 bis-akrylamid	TEMED	10 % APS (amónium persulfát)
Objem (na 1 gél)	5,79 ml	2 ml	2 ml	10 µl	200 µl

6.6. Sekvenovanie

Na sekvenovanie boli použité vybrané PCR produkty fytoplazmiem *'Ca*. Phytoplasma mali z izolátov prvej série (rok 2014, 17 vzoriek). Pri izolácii bol použitý QIA quick Gel Extraction Kit (podľa QIA quick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany). Na sekvenovanie bol využitý BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems™). Postup izolácie sa skladal z nasledujúcich krokov:

6.6.1. Izolácia PCR produktov z gélu

- 1) Pripravené PCR produkty boli rozdelené v 1% agarózovom géle v prostredí TAE puforu s etídium bromidom (na 50 ml gélu 2 µl etídium bromid (2,5mg/ml)) pri 80 V.
- 2) Za pomoci UV transiluminátora a sterilného skalpela boli PCR produkty vyrezané a umiestnené do jednotlivých zvážených mikroskúmaviek.
- 3) Ku gélu bol pridaný QG pufor v pomere 3:1, zmes bola inkubovaná v suchom kúpeli pri 50 °C, pokým sa gél nerozpustil, maximálne však po dobu 10 min (po 5 min bola zmes premiešaná).
- 4) Do mikroskúmavky bol pridaný 1 objem izopropanolu (na 100 µg váhy 100 µl izopropanolu) a obsah bol zvortexovaný.
- 5) Zmes bola napipetovaná do separačných koloniek, scentrifugovaná 1 min pri 13 000 g.
- 6) To čo pretieklo bolo vyliate, do koloniek bolo pridané 500 µl QG puforu a scentrifugované za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom kroku.
- 7) To čo pretieklo bolo vyliate, do kolonky bolo pridané 750 µl PE puforu a opätovne scentrifugované.
- 8) To čo pretieklo bolo vyliate, obsah v kolonke bol scentrifugovaný a kolónky boli premiestnené do novej 1,5ml mikroskúmavky.

- 9) Do každej mikroskúmavky bolo napipetované 30 μ l destilovanej vody a centrifugované za rovnakých podmienok.
- 10) Izolovaná DNA bola uchovávaná pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 11) Koncentrácia izolovanej DNA bola zmeraná na fluorometre (Hoefler DyNA Quant DQ 200, Amersham Biosciences).

6.6.2. Príprava vzoriek na sekvenovanie

- 1) Izolovaná DNA bola nariadená pre sekvenčnú reakciu v závislosti na dĺžke analyzovaného fragmentu: pre fragmenty o približnej dĺžke 1800 bp bolo použité 45 ng na reakciu, pre fragmenty o približnej dĺžke 1500 bp bolo použité 40 ng na reakciu, pre fragmenty o približnej dĺžke 600–800 bp bolo použité 35 ng na reakciu.
 - a) PCR produkty P1A/P7 boli amplifikované s primermi P1A, P7, fU5, M1, R2.
 - b) PCR produkty F1/B6 boli amplifikované s primermi F1, B6, M1, R2.
 - c) PCR produkty AP14/15 boli amplifikované s primermi AP14 a AP15.
 - d) PCR produkty AP15f/AP15r boli amplifikované s primermi AP15f a AP15r.
- 2) Pre jednotlivé primery bola pripravená univerzálna reakčná zmes pre sekvenovanie. Zloženie reakčnej zmesi vid' tabuľka 10.

Tabuľka 10: Zloženie reakčnej zmesi na sekvenovanie

Reakčná zmes	Koncentrácia	Pipetuj na 1 reakciu (μ l)
Pufor	1x	1
BigDye 3.1		1
Primer	1,6 pmol/ μ l	2

- 3) Reakčná zmes bola rozpipetovaná po 4 μ l do mikroskúmviek a k tomu bolo pridané 6 μ l nariadenej DNA. Podmienky PCR reakcie vid' tabuľka 11.

Tabuľka 11: Podmienky PCR reakcie amplifikátov pre sekvenovanie

Počiatková denaturácia	Denaturácia	Annealing (nasadenie primerov)	Predlžovanie	Dosyntetizovanie reťazcov
96 $^{\circ}\text{C}$, 1 min	96 $^{\circ}\text{C}$, 10 s	50 $^{\circ}\text{C}$, 5 s	60 $^{\circ}\text{C}$, 4 min	10 $^{\circ}\text{C}$, 10 min
	35x			

- 4) Vzorok boli následne sekvenované na genetickom analyzátoe ABI PRISM 3730 na pracovisku UEB ČSAV, Olomouc.

6.7. Analýza sekvencií

- 1) Jednotlivé výstupy sekvenátoru DNA analyzovaných fragmentov boli zložené do finálnych kontigov pomocou programu SeqMan (DNASTAR, Lasergene).
- 2) Identita získaných sekvencií bola potvrdená na základe porovnania so sekvenciami dostupnými v GenBank databáze s využitím programu Blast (BLAST, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).
- 3) Sekvencie jednotlivých získaných izolátov boli porovnané s typovými sekvenciami izolátov fytoplazmy proliferácie jablone odpovedajúcich genotypov. Ich genetická variabilita bola zistená pomocou programu ClustalW v aplikácii Mega 6.0.

7. Výsledky

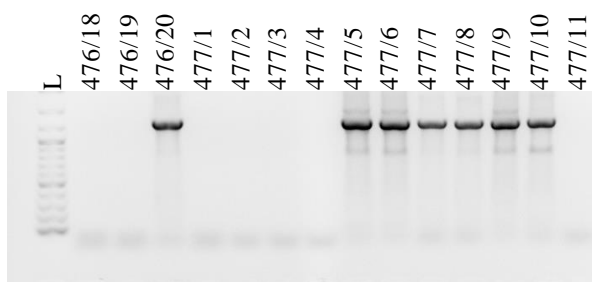
Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo štúdium epidemiológie fytoplazmy proliferácie jablone zamerané na hmyzí vektor, méru *Cacopsylla picta*. Študovala sa infekčnosť tohto vektora v priamej súvislosti s rôznymi pestovateľskými systémami aplikovanými v sledovaných sadoch a to v takzvanom integrovanom systéme a v sade v štádiu prechodu do organického režimu pestovania na lokalitách Bouzov-Kozov a určovalo sa riziko šírenia fytoplazmy spôsobujúcej proliferáciu jablone – 'Candidatus Phytoplasma mali' v týchto sadoch.

Za rok 2014 bolo nazbieraných 125 jedincov *Cacopsylla picta* z lekových dosiek, za rok 2015 to bolo 86 jedincov *Cacopsylla picta*. Ich dynamika bola sledovaná v dvojtyždňových intervaloch (viď tabuľka 2 v podkapitole 6.1.).

7.1. Detekcia a identifikácia fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali'

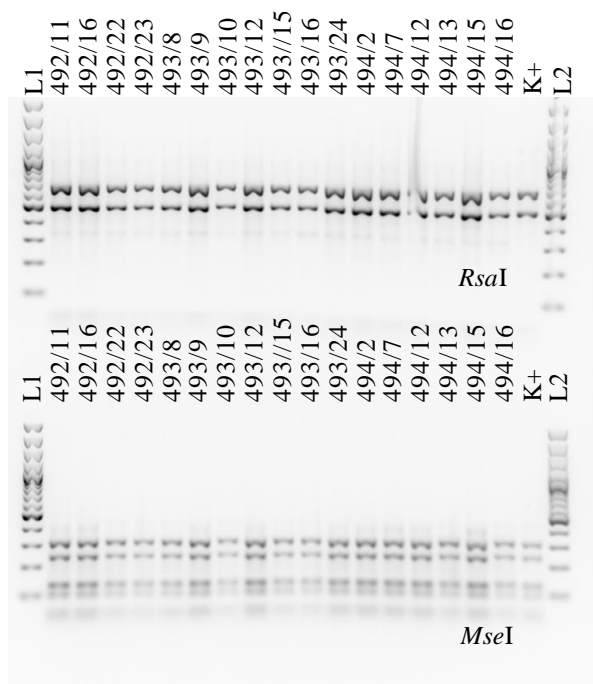
Fytoplazma bola detekovaná s využitím 'nested' PCR v 17 vzorkách v roku 2014 a 17 vzorkách z roku 2015 (viď obrázok 2). Pomocou RFLP analýzy s reštrikčnými endonukleázami *MseI*, *BfmI* a *RsaI* bola identifikovaná fytoplazma 'Ca. Phytoplasma mali' vo všetkých pozitívnych izolátoch z roku 2014 a v 15 pozitívnych izolátoch zo 17 z roku 2015. Zvyšné dve boli určené ako 'Ca. Phytoplasma prunorum', pôvodca Európskej žltacky kôstkovíc (viď obrázok č. 3 a 4).

Obrázok 2: Detekcia fytoplazmy v DNA hmyzích jedincov *Cacopsylla picta* pomocou amplifikácie úseku 16S-23S rDNA metódou PCR



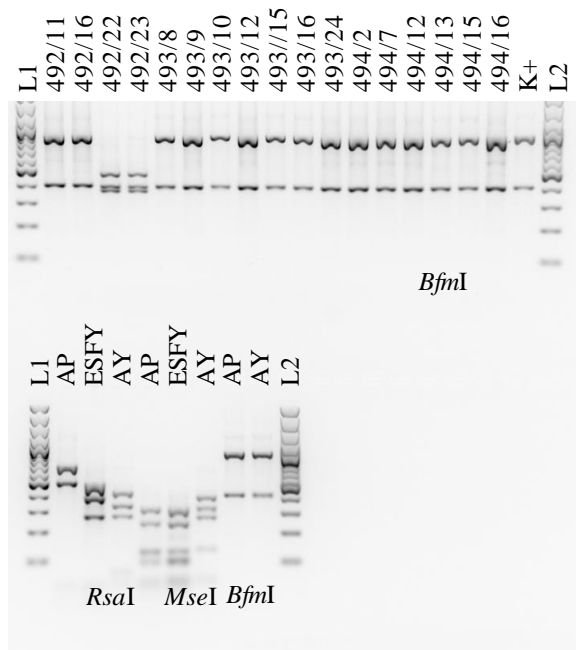
Legenda: L: Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami vzoriek

Obrázok 3: *RsaI*-RFLP a *MseI*-RFLP profily R16F2/R16R2 produktov izolátov fytoplaziem infikujúcich *Cacopsylla picta*



Legenda: L1, L2: Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, K+: pozitívna kontrola AP, (reštrikčné endonukleázy označené v obrázku)

Obrázok 4: *BfmI*-RFLP profily R16F2/R16R2 produktov izolátov fytoplaziem infikujúcich *Cacopsylla picta*



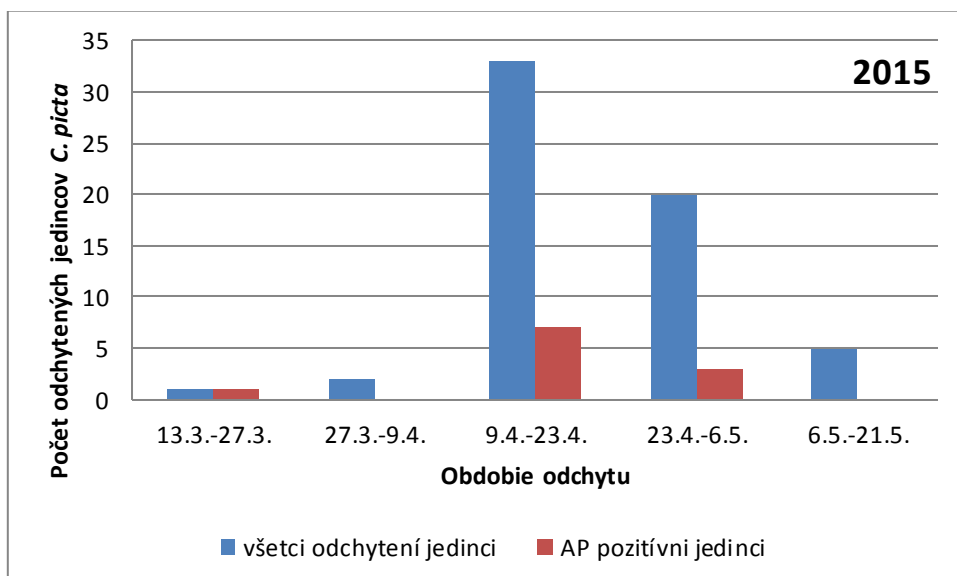
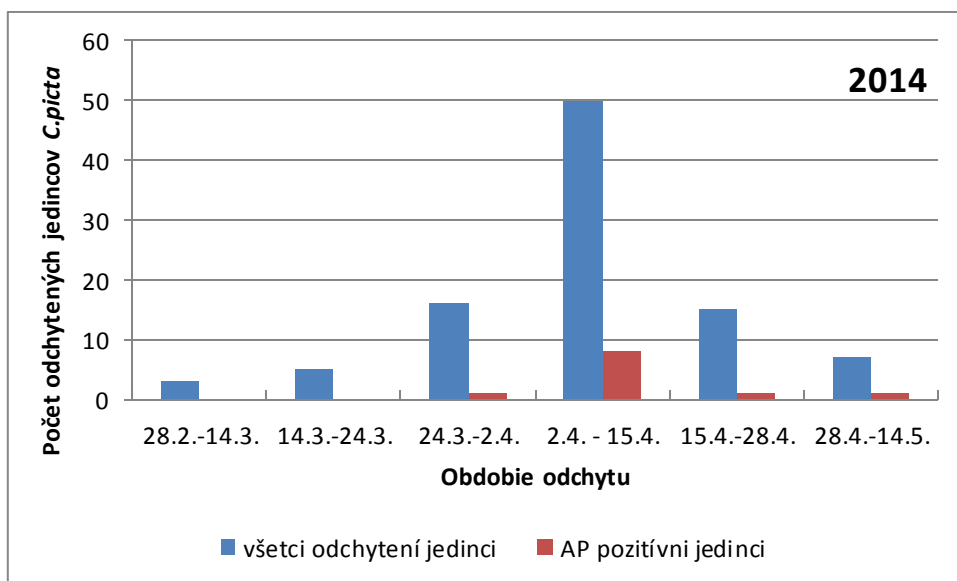
Legenda: L1, L2: Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, K+: pozitívna kontrola AP, AP: fytoplazma proliferácie jablone, ESFY: fytoplazma Európskej žltacky kôstkovíc, AY: fytoplazma žltacky astier, (reštrikčné endonukleázy označené v obrázku)

Detekcia fytoplazmy ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ u mér preukázala, že infekčnosť *C. picta* sa pohybuje od 11,5–20,7 % v závislosti na počte odchytených jedincov a type sadu. Prvé jedince boli odchytené na prelome februára a marca alebo na začiatku marca. Najväčší výskyt jedincov a teda aj najviac odchytených jedincov bolo v obdobiach 2.4. - 15.4. 2014 a 9.4. - 23.4. 2015. V týchto obdobiach pritom bol detekovaný aj najvyšší počet infekčných jedincov. V sade s integrovaným režimom pestovania pri včasných aplikáciách postrekov bol pozorovateľný pokles celkového výskytu jedincov mér, pri neskorších aplikáciách postrekov nebol badateľný žiadny pokles v početnosti mér. Poslední odchytení jedinci boli v oboch rokoch koncom mája (viď tabuľka 12, grafy 1, 2, 3 a 4).

Tabuľka 12: Zastúpenie odchytených jedincov *Cacopsylla picta* v dvoch sadoch za roky 2014 a 2015

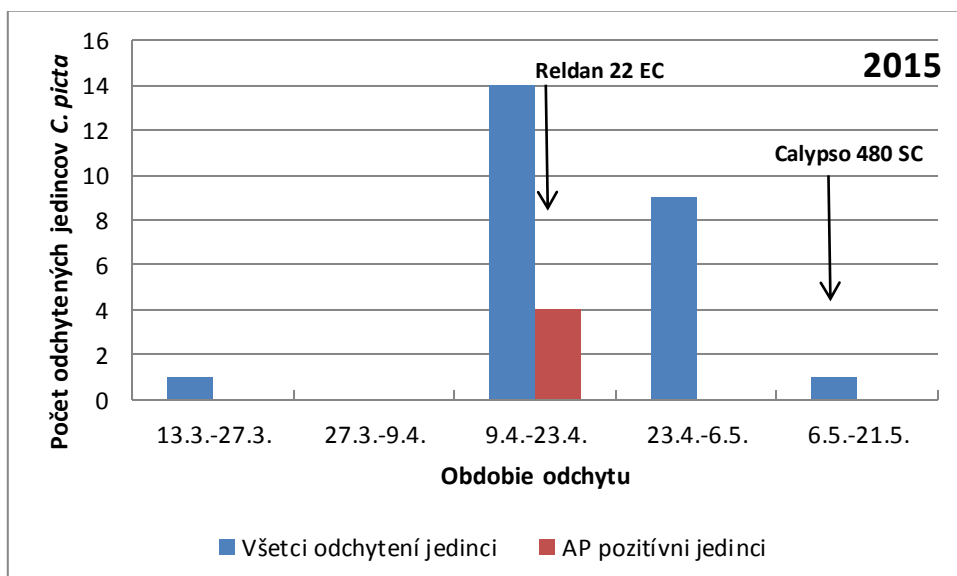
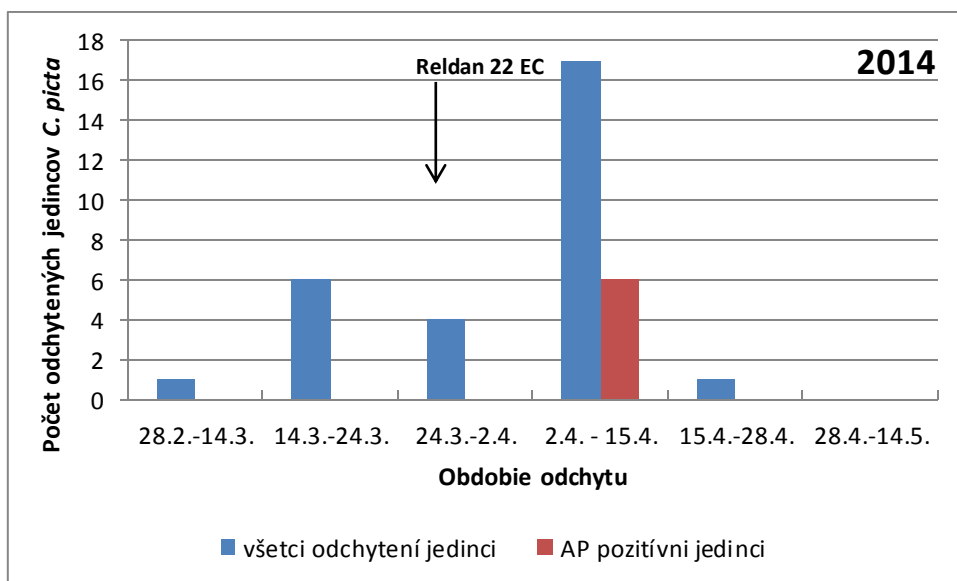
	<i>C. picta</i>	EKO		PROD	
		Počet odchytených jedincov	Počet AP pozitívnych jedincov	Počet odchytených jedincov	Počet AP pozitívnych jedincov
2014	28.2.-14.3.	3	0	1	0
	14.3.-24.3.	5	0	6	0
	24.3.-2.4.	16	1	4	0
	2.4.-15.4.	50	8	17	6
	15.4.-28.4.	15	1	1	0
	28.4.-14.5.	7	1	0	0
Celkový počet		96	11	29	6
Zastúpenie pozitívnych jedincov		11,5 %		20,7 %	
2015	13.3.-27.3.	1	1	1	0
	27.3.-9.4.	2	0	0	0
	9.4.-23.4.	33	7	14	4
	23.4.-6.5.	20	3	9	0
	6.5.-21.5.	5	0	1	0
Celkový počet		61	11	25	4
Zastúpenie pozitívnych jedincov		18,03 %		16 %	

Grafy 1 a 2: Populačná dynamika a infekčnosť *Cacopsylla picta*, EKO sad



Legenda: populačná dynamika mér v sade v štádiu konverzie do organického režimu pestovania, lokalita Bouzov-Kozov, rok 2014 a 2015

Grafy 3 a 4: Populačná dynamika a infekčnosť *Cacopsylla picta*, PROD sad



Legenda: populačná dynamika mér v sade v integrovanom režime pestovania, lokalita Bouzov-Kozov, rok 2014 a 2015, šípkou označené obdobia aplikácie postrekov

7.2. Analýza genetickej variability fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*'

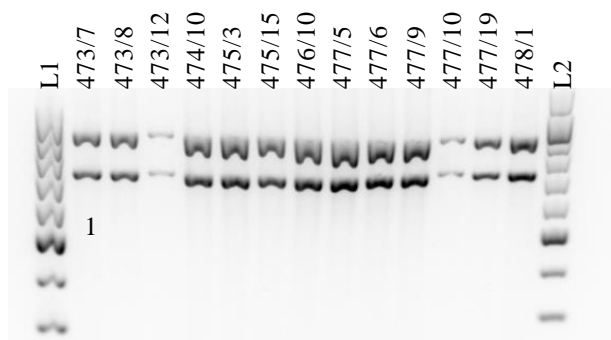
Výsledky RFLP analýzy a sekvenovania jednotlivých génov sú v tabuľkách na konci každej podkapitoly (viď tabuľka 13, 14 a 15).

7.2.1. Gén pre 16S-23S rRNA

P1A/P7A fragment pokrývajúci oblasť 16S-23S rDNA bol úspešne získaný u 22 izolátov. Všetky testované izoláty vykazovali *FauI*-RFLP profil odpovedajúci genotypu A (príklad viď obr. 5).

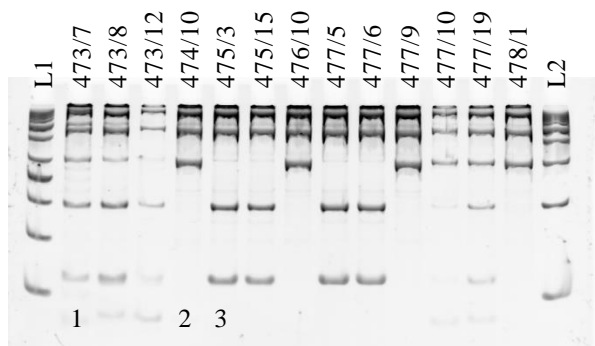
HpaII-RFLP analýzou bol zistený profil odpovedajúci genotypu P-I u 5 izolátov detekovaných v roku 2014 a 7 izolátov v roku 2015, profil genotypu P-II u 5 a 1 izolátu. Zmiešaná infekcia izolátov s genotypom P-I a P-II bola zistená v troch prípadoch v roku 2014 a jednom prípade v roku 2015 (viď obr. 6).

Obrázok 5: P1A/P7A-*FauI*/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L1: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, L2: Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), 1: genotyp A

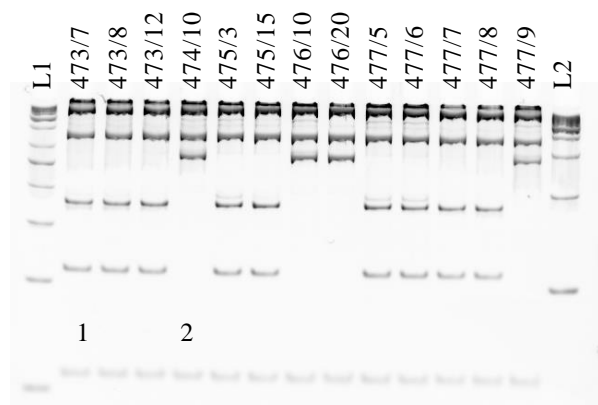
Obrázok 6: P1A/P7A-*HpaII*/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L1: Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, L2: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas), 1: genotyp PI+PII, 2: genotyp PII, 3: genotyp PI

F1/B6 fragment oblasti 16S-23S rDNA bol úspešne získaný u všetkých 32 izolátov. Vzor odpovedajúci genotypu '1' bol u 7 izolátov detekovaných v roku 2014 a 6 izolátov z roku 2015. Vzor '2' bol u 9 izolátov z roku 2014 a 9 izolátov z roku 2015. Zmesná infekcia izolátov s genotypom '1' a '2' bola zistená v jednom prípade v roku 2014. Príklad výsledku RFLP analýzy vid' obrázok 7.

Obrázok 7: F1/B6-*HpaII*/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L1: Gene RulerTM 50 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, L2: Gene RulerTM 100 bp DNA ladder (Fermentas), 1: genotyp '2', 2: genotyp '1'

Následným sekvenovaním boli u všetkých sedemnástich izolátov detekovaných v roku 2014 získané sekvencie fragmentov 16S-23S rDNA, u trinástich izolátov boli získané sekvencie P1A/P7 fragmentov 16S-23S rDNA dlhé 1636–1686 bp a u 4 izolátov sekvencie F1/B6 fragmentov dlhých 1555–1566 bp.

Sekvencie všetkých izolátov vykazovali vysokú identitu so sekvenciami v databáze GenBank. S referenčnou sekvenciou fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali', izolát AP15 (Acc. No. AJ542541.1) vykazovali 99% identitu, ďalšími príkladmi sekvencií izolátov fytoplazmiem proliferácie jablone boli napr. izolát AP (Acc. No. JF715059.1) s 99% identitou, izolát 113 2010 (Acc. No. JN555597.1) so 100% identitou alebo izolát T-16 (Acc. No. EF392655.1) s 99% identitou. V sekvenciách izolátov z oboch sadov boli zaznamenané 2 variabilné miesta, u 15-tich izolátov záměna T/C v odpovedajúcej pozícii 1420 referenčnej sekvencie, u 8 izolátov záměna C/T v odpovedajúcej pozícii 1589 referenčnej sekvencie.

Zistená sekvenčná variabilita bola s výnimkou troch izolátov v súlade s variabilitou génu pre 16S-23S rDNA zistenou pomocou enzýmov *HpaII* a *FauI* pri RFLP analýze. V týchto troch prípadoch vykazovala RFLP analýza zmiešanú infekciu izolátov s genotypom PI a PII, pričom sekvenovaním bola potvrdená prítomnosť len jedného

genotypu, v dvoch prípadoch prítomnosť genotypu PI a v jednom prípade prítomnosť genotypu PII.

Tabuľka 13: Genetická variabilita génu pre 16S-23S rRNA izolátov fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

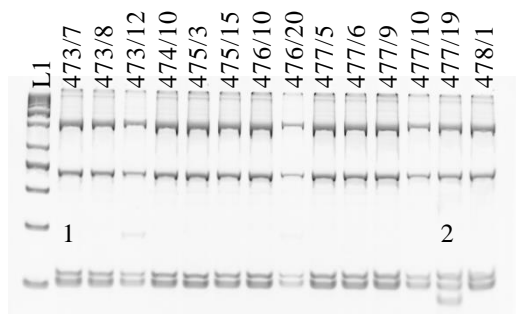
		Gén pre 16S-23S rRNA								
2014		RFLP		Sekvencia			2015	RFLP		
		P1A/P7		F1/B6	PCR produkt	T/C	C/T	P1A/P7		F1/B6
Izolát	<i>HpaII</i>	<i>FauI</i>	<i>HpaII</i>	Izolát				<i>HpaII</i>	<i>FauI</i>	<i>HpaII</i>
473/7	PI+PII	A	‘2’	P1A/P7	+	-	492/11	PI	A	‘2’
473/8	PI+PII	A	‘2’	P1A/P7	+	-	492/16	PI+PII	A	‘1’
473/12	PI	A	‘2’	P1A/P7	+	-	492/22	nt	nt	nt
474/10	PII	A	‘1’	P1A/P7	+	+	492/23	nt	nt	nt
475/3	PI	A	‘2’	P1A/P7	-	-	493/8	nt	nt	‘1’
475/15	PI	A	‘2’	P1A/P7	-	-	493/9	PII	A	‘1’
476/10	PII	A	‘1’	P1A/P7	+	+	493/10	nt	nt	‘1’
476/20	nt	nt	‘1’	F1/B6	+	+	493/12	PI	A	‘2’
477/5	PI	A	‘2’	P1A/P7	+	-	493/15	nt	nt	‘1’
477/6	PI	A	‘2’	P1A/P7	+	-	493/16	nt	nt	‘1’
477/7	nt	nt	‘2’	F1/B6	+	-	493/24	PI	A	‘2’
477/8	nt	nt	‘2’	F1/B6	+	-	494/2	PI	A	‘2’
477/9	PII	A	‘1’	P1A/P7	+	+	494/7	PI	A	‘2’
477/10	PII	A	‘1’	P1A/P7	+	+	494/12	PI	A	‘2’
477/19	PI+PII	A	‘1’+‘2’	P1A/P7	+	+	494/13	nt	nt	‘2’
478/1	PII	A	‘1’	P1A/P7	+	+	494/15	PI	A	‘2’
478/13	nt	nt	‘1’	F1/B6	+	+	494/16	nt	nt	‘2’

Legenda: nt - netestované

7.2.2. Gén pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3

AP15f/AP15r fragment pokrývajúci oblasť DNA kódujúcu ribozomálne proteíny rpl22-rps3 bol úspešne získaný celkovo u 23 izolátov, pričom *AluI*-RFLP profil odpovedajúci genotypu ribozomálnej podskupiny rpX-A bol identifikovaný u 13 izolátov detekovaných v roku 2014 a 6 izolátov detekovaných v roku 2015. Profil rpX-B bol identifikovaný u 1 izolátu v roku 2014 a 3 izolátov v roku 2015 (viď obrázok 8).

Obrázok 8: AP15f/AP15r-*Alu*II/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L1: Gene RulerTM 50 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, 1: genotyp A, 2: genotyp B

U štrnástich izolátov z roku 2014 boli získané sekvencie AP15f/AP15r fragmentov génu kódujúceho ribozomálne proteíny rpl22-rps3 dlhé 834–862 bp.

Sekvencie všetkých izolátov vykazovali vysokú identitu so sekvenciami v databáze GenBank. S referenčnou sekvenciou fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma mali', izolát AT (Acc. No. EF193367.1) vykazovali 99% identitu, ďalšími príkladmi sekvencií izolátov fytoplaziem proliferácie jablone boli napr. izolát APSb (Acc. No. EF193368.1) so 100% identitou, izolát AP15 (Acc. No. EF193366.1) s 99% identitou alebo izolátom AT (Acc. No. CU469464.1) s 99% identitou.

V sekvenciách izolátov z oboch sádov boli zaznamenané 2 variabilné miesta, u jedného izolátu záměna G/A v odpovedajúcej pozícii 105 referenčnej sekvencie, u 13-tich izolátov duplikácia 12-nukleotidového úseku v odpovedajúcej pozícii 199–210 referenčnej sekvencie.

Zistená sekvenčná variabilita bola v súlade s variabilitou génu pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3 zistenou pomocou enzýmu *Alu*I pri RFLP analýze.

Tabuľka 14: Genetická variabilita génu pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3 izolátov fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

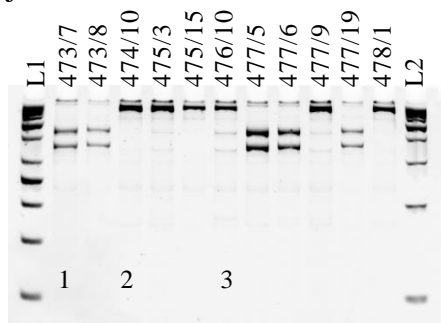
Gén pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3							
2014					2015		
Izolát	PCR produkt	RFLP genotyp	Sekvencia		Izolát	PCR produkt	RFLP genotyp
			G/C	Duplikácia			
473/7	+	A	-	+	492/11	+	A
473/8	+	A	-	+	492/16	+	B
473/12	+	A	-	+	492/22	nt	nt
474/10	+	A	-	+	492/23	nt	nt
475/3	+	A	-	+	493/8	-	nt
475/15	+	A	-	+	493/9	+	B
476/10	+	A	-	+	493/10	-	nt
476/20	+	A	-	+	493/12	+	A
477/5	+	A	-	+	493/15	-	nt
477/6	+	A	-	+	493/16	-	nt
477/7	-	nt	nt	nt	493/24	+	A
477/8	-	nt	nt	nt	494/2	+	A
477/9	+	A	-	+	494/7	+	A
477/10	+	A	-	+	494/12	+	B
477/19	+	B	+	-	494/13	-	nt
478/1	+	A	-	+	494/15	-	nt
478/13	-	nt	nt	nt	494/16	+	A

Legenda: nt - netestované

7.2.3. Gén pre nitroreductase-like proteín

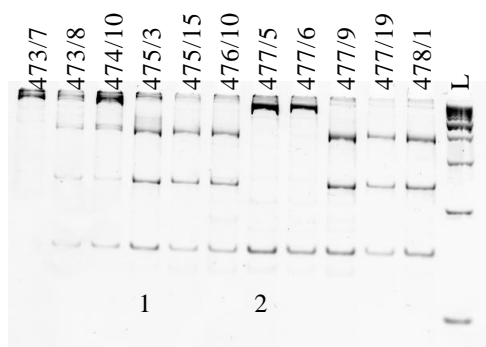
AP14/AP15 fragment pokrývajúci oblasť DNA kódujúcu nitroreductase-like proteín bol úspešne získaný u 21 izolátov. Jedenásť izolátov z roku 2014 bolo podrobených RFLP analýze, pričom *HincII* a *PagI*-RFLP profil odpovedajúci genotypu podtypu fytoplazmy AT-1 bol identifikovaný u 2 izolátov, profil odpovedajúci genotypu AT-2 u 3 izolátov a profil odpovedajúci genotypu AP15 u 4 izolátov. Zmesná infekcia izolátov s genotypom AT-1 a AP15 bola zistená v dvoch prípadoch (viď obr. 9). U zvyšných 10 izolátov z roku 2015 boli genotypy určené na základe sekvencií, pričom tieto údaje boli poskytnuté Mgr. Danou Šafařovou, Ph.D. Na základe týchto sekvencií bol identifikovaný *HincII* a *PagI*-RFLP profil odpovedajúci genotypu podtypu fytoplazmy AT-1 u 6 izolátov, profil odpovedajúci genotypu AT-2 u 1 izolátu a profil odpovedajúci genotypu AP15 u 3 izolátov. Zmesná infekcia izolátov nebola zaznamenaná (viď obr. 10).

Obrázok 9: AP14/AP15-*HincII*/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L1, L2: Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, kombinácia profilu označeného 1 (na obrázku 9) a profilu označeného 1 (na obrázku 10): genotyp AT-1, kombinácia profilu označeného 1 (na obrázku 9) a profilu označeného 2 (na obrázku 10): genotyp AT-2, kombinácia profilu označeného 2 (na obrázku 9) a profilu označeného 1 (na obrázku 10): genotyp AP15, kombinácia profilu označeného 3 (na obrázku 9) a profilu označeného 1 (na obrázku 10): genotyp AT-1+AP15

Obrázok 10: AP14/AP15-*PagI*/RFLP profily vybraných izolátov fytoplazmy proliferácie jablone



Legenda: L: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, 1 a 2: popis genotypu vid' legenda obrázku 9

U jedenástich izolátov z roku 2014 boli získané sekvencie AP14/AP15 fragmentov génu kódujúceho nitroreductase-like proteín dlhé 657–717 bp, dva izoláty boli určené ako zmesné infekcie a preto nebolo možné získať ich sekvencie.

Sekvencie všetkých získaných izolátov vykazovali vysokú identitu so sekvenciami v databáze GenBank. S referenčnou sekvenciou fytoplazmy ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’, izolát AT-2 (Acc. No. JN642113.1) vykazovali 99% identitu, ďalšími príkladmi sekvencií izolátov fytoplazmiem proliferácie jablone boli napr. izolát AP-15 (Acc. No. JN642117.1) s 99% identitou, izolát AT-1 (Acc. No. JN642115.1) s 99% identitou alebo izolát AT-1 (Acc. No. HG798805.1) s 99% identitou. V sekvenciách boli zaznamenané 2 variabilné miesta, u ôsmich izolátov zámena A/C v odpovedajúcej pozícii 340 referenčnej sekvencie, u piatich izolátov zámena G/C v odpovedajúcej pozícii 376 referenčnej sekvencie.

Zistená sekvenčná variabilita bola v súlade s variabilitou génu pre nitroreductase-like proteín zistenou pomocou enzýmov *HincII* a *PagI* pri RFLP analýze.

Tabuľka 15: Genetická variabilita génu pre nitroreductase-like proteín izolátov fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*'

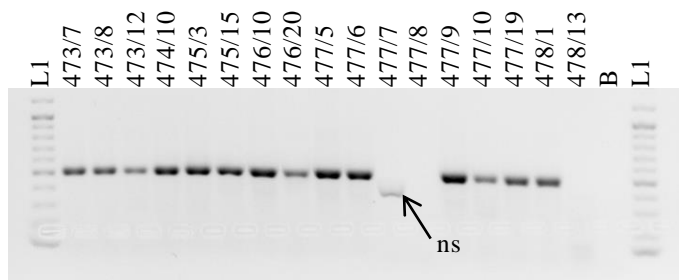
Gén pre nitroreductase-like proteín							
2014					2015		
Izolát	PCR produkt	RFLP genotyp	Sekvencia		Izolát	PCR produkt	RFLP genotyp
			A/C	G/C			
473/7	+	AT2	-	-	492/11	+	AT1
473/8	+	AT1	+	-	492/16	+	AT1
473/12	-	nt	+	-	492/22	nt	nt
474/10	+	AP15	+	+	492/23	nt	nt
475/3	+	AP15	nt	nt	493/8	+	AT1
475/15	+	AP15	+	+	493/9	+	AT1
476/10	+	AP15+AT1	nt	nt	493/10	-	nt
476/20	-	nt	+	+	493/12	+	AT15
477/5	+	AT2	-	-	493/15	-	nt
477/6	+	AT2	-	-	493/16	-	nt
477/7	-	nt	nt	nt	493/24	+	AP15
477/8	-	nt	nt	nt	494/2	+	AT2
477/9	+	AP15+AT1	nt	nt	494/7	+	AP15
477/10	-	nt	+	+	494/12	+	AT1
477/19	+	AT1	+	-	494/13	-	nt
478/1	+	AP15	+	+	494/15	+	AT1
478/13	-	nt	nt	nt	494/16	-	nt

Legenda: nt - netestované

7.2.4. Gén pre HflB proteázu

Fragment pokrývajúci fHflB3-1/rHflB3 oblasť DNA kódujúcu HflB proteázu bol úspešne získaný u 14 izolátov v roku 2014 a u 14 izolátov v roku 2015 (viď obrázok 11), v štyroch prípadoch sa nepodarilo pomocou AP špecifických primerov získať produkt. Tieto izoláty neboli podrobené RFLP analýze ani sekvenovaniu.

Obrázok 11: Detekcia génu pre HflB proteázu u izolátov fytoplazmy proliferácie jablone získaných z DNA hmyzích jedincov *Cacopsylla picta* metódou PCR so špecifickými primermi



Legenda: L1, L2: Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas), dráhy označené číslami izolátov, B: negatívna kontrola, ns: nešpecifický produkt označený šípkou

8. Diskusia

Fytoplazma proliferácie jablone predstavuje dnes jednu z ekonomicky najvýznamnejších fytoplazmových chorôb jabloní v Európe (Seemüller *et al.*, 2011). Výskumy v Českej republike zamerané na jej detekciu sa prevádzajú už desaťročia a to hlavne s cieľom zaistiť opatrenia proti jej ekonomickému dopadu. Experimentálna časť tejto bakalárskej práce bola zameraná na štúdium vektora fytoplazmy proliferácie jablone, *Cacopsylla picta* a stanovenie jeho vplyvu na šírenie fytoplazmy. V oboch sledovaných sadoch (sad s integrovaným režimom pestovania a sad vo fáze prechodu do organického režimu pestovania) sa percentuálny výskyt mér infikovaných fytoplazmou proliferácie jablone pohyboval v rozmedzí 11,5–20,7 %, čo predstavuje o niečo nižšiu mieru výskytu, ktorá bola na území Českej republiky preukázaná v predchádzajúcom období (Fránová *et al.*, 2014). V porovnaní s údajmi z Nemecka, severného Francúzska a Švajčiarska je zistené percentuálne zastúpenie infekčných mér *Cacopsylla picta* v Českej republike vyššie, v niektorých prípadoch bolo zaznamenané až dvojnásobne vyššie zastúpenie infekčných jedincov (Jarausch *et al.*, 2007). V súlade so štúdiami zaznamenávajúcimi rozdiel vo výskyte mér v sade s integrovaným režimom pestovania a v sade vo fáze konverzie do organického (Suchá *et al.*, 2015) bol preukázaný vyšší výskyt mér v druhom spomínanom type sadu. Či bude trend zachovaný a výskyt mér sa po ustálení rovnováhy v sade zníži môže byť predmetom ďalších štúdií. Rozdiel v infekčnosti mér vyskytujúcimi sa v dvoch odlišných typoch sadov nebol preukazný (Šafařová *et al.*, 2016b). S ohľadom na dobu aplikácie insekticídnych postrekov v sade s integrovaným režimom pestovania, bola táto aplikácia značne úspešnejšia v roku 2014, než v roku 2015. V prvom roku sa doba aplikácie prekrývala s dobou náletu hmyzu a insekticídny účinok eradikoval populácie hmyzu vrátane mér. V roku 2015 však doba aplikácie neprebehla v dobe náletu, výsledkom bol minimálny vplyv chemikálii na výskyt hmyzu. Populačná dynamika mér *Cacopsylla picta* v sadoch bola v súlade so štúdiami prevádzanými v Českej republike a okolitých krajinách, čo znamená prvý výskyt prezimujúcich jedincov na prelome februára a marca, najvyššie zaznamenané počty jedincov mér v apríli a úbytok jedincov na konci mája (Čermák a Lauterer, 2008; Mattedi *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2002; 2009).

Analýzou genetickej variability izolátov fytoplazmy proliferácie jablone detekovaných v mérach *Cacopsylla picta* bola zistená malá variabilita medzi jednotlivými genotypmi. Preukázaný častejší výskyt genotypu rpX-A a menší výskyt genotypu rpX-B, ako aj

častejší výskyt profilov P-I a "2", menší výskyt profilov P-II a "1" a ojedinelé prípady prítomnosti zmesi izolátov profilov P-I+P-II, odpovedajú frekvencii vo výskyte genotypov v jablčných výsadbách v Českej republike. Naopak približne rovnaký výskyt genotypov AT-1, AT-2 a AP15 za rok 2014 a častejší výskyt genotypu AT-1 v roku 2015 bol v protiklade so zisteniami analýzy genetickej variability AP v jablčných sadoch v Českej republike, kde bol preukázaný častejší výskyt genotypov AP15 a AT-2 (Fránová *et al.*, 2011; 2013). Zistená genetická variabilita fytoplazmy proliferácie jablone u miera *Cacopsylla picta* bola porovnateľná so zistenou genetickou variabilitou izolátov fytoplazmy AP detekovanou u hostiteľských rastlín jabloní v tej samej lokalite v rovnakom období (Bílková, 2016).

Analýza genetickej variability fytoplazmy AP u hmyzieho vektora navyše potvrdila prítomnosť zmesných infekcií rôznymi genotypmi toho istého kmeňa 'Ca. Phytoplasma mali', pričom doteraz boli štúdiami u *C. picta* potvrdené zmesné infekcie iba odlišnými podskupinami fytoplaziem (Ermacora *et al.*, 2007). Tieto výsledky sú jedny z prvých potvrdzujúcich, že méra *C. picta* môže byť infikovaná takýmto typom zmesnej infekcie. Väčšina zmesných infekcií bola potvrdená ako RFLP analýzou, tak aj výsledkom sekvenovania. Za príčinou nezhody u troch izolátov a vyvrátenie prítomnosti zmesnej infekcie sekvenovaním sa pokladá nízka koncentrácia jedného z dvoch prítomných genotypov fytoplaziem a jeho slabý signál pri sekvenovaní.

9. Záver

V tejto práci bola študovaná populačná dynamika mér *Cacopsylla picta* v sade v integrovanom režime pestovania a v sade v štádiu konverzie do organického režimu pestovania. Bola analyzovaná prítomnosť fytoplazmy proliferácie jablone a genetická variabilita detekovaných izolátov. V sade v štádiu konverzie do organického režimu pestovania bolo na žltých lepoých doskách odchytených 96 v roku 2014 a 61 jedincov *Cacopsylla picta* v roku 2015. V sade v integrovanom režime pestovania bolo v roku 2014 odchytených 29 jedincov *Cacopsylla picta* a 25 jedincov v roku 2015. Infekčnosť v sadoch sa pohybovala v rozmedzí hodnôt 11,5–20,7 %, avšak rozdiel v infekčnosti mér v dvoch rozdielnych typoch sadov bol nepreukazný. V sade v integrovanom režime pestovania bol po aplikácii insekticídnych postrekov v roku 2014 pozorovaný nižší výskyt mér *Cacopsylla picta*, v roku 2015 tento trend nebol taký výrazný. Jarná migrácia mér na hostiteľské rastliny v oboch typoch sadov v oboch rokoch prebiehala na prelome februára a marca, spätná migrácia nových jedincov na zimoviská prebiehala na konci mája.

Genetická variabilita izolátov fytoplazmy proliferácie jablone nevykazovala vysokú variabilitu. Analýzou génu 16S-23S rDNA bola zistená prítomnosť izolátov odpovedajúcich profilom P-I, P-II, "1", "2", s častejšími výskytmi profilov P-I a "2", a ojedinelé prípady zmesi izolátov profilov P-I+P-II a "1"+"2". Výskyt týchto zmesných fytoplazmových infekcií detekovaných RFLP analýzou však nebol potvrdený sekvenovaním. Analýzou génu pre ribozomálne proteíny rpl22-rps3 bola preukázaná prítomnosť genotypov rpX-A, ktoré prevládali nad izolátmi genotypov rpX-B. Analýzou génu pre nitroreductase-like proteín bola preukázaná prítomnosť genotypov AT-1, AT-2 a AP15 s prevládajúcim výskytom genotypu AT-1.

Unikátnym zistením práce je potvrdenie jedinečného výskytu zmesnej infekcie AP fytoplazmy genotypov AT-1 a AP15 infikujúcich jedného jedinca vektoru *Cacopsylla picta*.

10. Zoznam použitej literatúry

- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828–832.
- Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E. (1993): Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 686–691.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Arzone, A. (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 115–121.
- Al-Saady, N.A., Khan, A.J., Calari, A., Al-Subhi, A.M., Bertaccini, A. (2008): 'Candidatus Phytoplasma omanense', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 461–466.
- Ambroziè Turk, B., Mehle, N., Brzin, J., Škerlevaj, V., Seljak, G., Ravnikar, M. (2008): High infection pressure of ESFY phytoplasma threatens the cultivation of stone fruit species. *Journal of Central European Agriculture* 9 (4), 795–802.
- Andersen, M.T., Longmore, J., Liefing, L.W., Wood, G.A., Sutherland, P.W., Beck, D.L., Forster, R.L.S. (1998): Phormium yellow leaf phytoplasma is associated with strawberry lethal yellows disease in New Zealand. *Plant Disease* 82, 606–609.
- Arocha, Y., Lopez, M., Pinol, B., Fernandez, M., Picornell, B., Almeida, R., Palenzuela, I., Wilson, M.R., Jones, P. (2005): 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(6), 2451–2463.
- Arocha, Y., Antesana, O., Montellano, E., Franco, P., Plata, G., Jones, P. (2007): 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57 (8), 1704–1710.
- Avinent, L., Llácer, 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., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Wogenhout, S.A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188, 3682–3696.
- Barbara, D.J., Morton, A., Clark, M.F., Davies, D.L. (2002): Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phylloidy) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148, 157–167.
- Baric, S., Dalla Via, J. (2004): A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* 57, 135–145.
- Battle, A., Laviña, A., Garcia-Chapa, M., Sabaté, J., Folch, C., Asin, L. (2004): Comparative results between different detection methods of virus and phytoplasma for a pear and apple certification program. *Acta Horticulturae* 657, 71–77.
- Belien, T., Peusens, G., Bangels, E. (2013): Integrated control of psyllid vectors of European fruit tree phytoplasmas. *Phytopathogenic Mollicutes* 3, 31–36.
- 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, J., Maier, G., Seemüller, E. (1999): Isolation of a gene encoding an immunodominant membrane protein gene in the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937v1943.
- Berges, R., Rott, M., Seemüller, E. (2000): Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90, 1145–1152.
- Bertaccini, A., Davis, R.E., Lee, I.-M., Conti, M., Dally, E.L., Douglas, S.M. (1990): Detection of Chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism (MLO) by dot-hybridization and Southern blot analysis. *Plant Disease* 74, 40–43.
- Bertaccini, A., Bellardi, M.G., Vibio, M. (1996): Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. Infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia mediterranea* 35, 129–132.
- Bertaccini, A., Vibio, M., Janeckova, M., Franova-Honetslegrova, J. (1997): Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms in the Czech republic. Pp. 102–103. Proceedings of the 17th Symposium on virus and virus like diseases of temperate fruit crops, Bethesda, Maryland, United States of America.
- Bertaccini, A., Botti, S., Martini, M., Colla, R., Mazzali, G., Mazio, P., Pozza, M., Meglioraldi, S., Vingione, M. (2001): La Flavescenza dorata in Emilia: caratterizzazione molecolare del ceppo in fase di diffusione. *L'Informatore Agrario* 47, 97–100.
- Bertaccini, A., Franova, J., Botti, S. & Tabanelli, D. (2005). Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciation in the Czech Republic. *FEMS Microbiol Letters* 249, 79–85.
- Bertaccini, A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673–689.
- Bertaccini, A., Calari, A., Felker, P. (2007): Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60, 257–258.
- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., Contaldo, N. (2014): Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5, 1763–1788.
- Bertamini, M., Nedunchezian, N. (2001): Effect of Phytoplasma, Stolbur-Subgroup (Bois Noir-BN)] of Photosynthetic Pigments, Saccharides, Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase, Nitrate and Nitrite Reductases and Photosynthetic Activities in Field-Grow Grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Chardonnay) Leaves. *Photosynthetica* 39, 119–122.
- Bílková, L. (2016): Molekulárně-genetická charakteristika fytoplazmy proliferace jabloně ('*Ca. Phytoplasma mali*') v kontextu latentních infekcí jabloní. *Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci.*
- Blatný, C. jun., Blatný, C. (1960): A contribution to the question of the group-appartenance of the virus proliferation of apples. *Folia microbiologia* 5, 336–342.
- Blatný, C. jun., Seidl, V., Erbenová, M. (1963): The Apple proliferation of various sorts and the possible strain differentiation of the virus. *Phytopathologia Mediteranea* 2, 119–123.
- Blažek, J., Vavra, 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.
- Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., Kirkpatrick, B. C. (2001): An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is

- distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147, 571–580.
- Blumer, S., Bovey, R. (1957): On apple proliferation virus. *Phytopathologische Zeitschrift* 30, 237–258.
- Bonnet, F., Saillard, C., Kollar, A., Seemüller, E., Bové, J.M. (1990): Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 3, 438–443.
- Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G., Conti, M. (1997): Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83, 219–24.
- Bovey, R. (1963): Apple proliferation. Virus diseases of apples and pears. Technical Communication - Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops 30, 63–67.
- Bovey, R. (1972): Maladie des proliférations. *La défense des plantes cultivées* 6, 227–231.
- Burckhardt, D. (1994): Psylloid pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea): A review. *Entomology (Trends in Agricultural Sciences)* 2, 173–186.
- CABI (2011): Crop Protection Compendium: *Phytoplasma mali* (apple proliferation); *Phytoplasma australiense* (Australian grapevine yellows); *Phytoplasma prunorum* (apricot chlorotic leafroll). Wallingford, UK. Accessed October 21, 2011.
- CABI (2015): Invasive Species Compendium. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/6502> [11.02.2016]
- Carraro, L., Loi, N., Emarcora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107, 695–700.
- Carraro, L., Ferrini, F., Emarcora, P., Loi, N., and Labonne, G. (2008): Infectivity of *Cacopsylla picta* (Syn. *C. costalis*), vector of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in North East Italy. *Acta Horticulturae* 781, 403–408.
- Casati, P., Quaglino, F., Tedeschi, R., Spiga, M. F., 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, 81–87.
- Ciccotti, A. M., Bianchedi, P., Bragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F., Mattedi, L. (2007): Transmission of ‘*Candidatus phytoplasma mali*’ by root bridges under natural and experimental conditions. *Bulletin of Insectology* 60 (2), 387–388.
- Cieślińska, M., Kruczyńska, D. (2011): Molecular detection of phytoplasmas infecting apple trees in Poland. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S73–S74.
- 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 (3), 123–128.
- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., Boudonpadiou, E. (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42, 151–157.
- Conci, L., Saavedra, P., Guzmán, F., Fernández, F., Galdeano, E., Grosso, T.P., Torres, L., Meneguzzi, N. (2014): Advances in knowledge about phytoplasma diseases in Argentina. Pp. 82–89. Bertaccini A. (ed.) *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*. COST Action FA0807. IPWG. Bologna, Italy.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N.A., Oropeza, C. (2003): In situ detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology* 4, 99–108.

- Čermák, V., Lauterer, P. (2008): Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect of the vectors of the Apple Proliferation cluster phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 61, 147–148.
- Dai, Q., He, F.T., Liu, P.Y. (1997): Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. *Plant Pathology* 46, 56–61.
- Danielli, A., Bertaccini, A., Alma, A., Bosco, D., Vibio, M., Arzone, A. (1996): May evidence of 16SrI-group-related phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball suggest their transovarial transmission? *IOM Letters* 4, 190–191.
- 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., Dally, E. L. (1998a): Interoperon sequence heterogeneity and differential PCR-mediated amplification of sequences from the two rRNA operons in phytoplasma. Pp. 176–177. *Proceedings of the 12th International Conference, International Organization of Mycoplasma, Sydney, Australia.*
- Davis, R.E., Jomantiene, R., Dally, E.L., Wolf, T.K. (1998b): Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. *Vitis* 37, 131–137.
- Delong, D. M., Severin, H. H. P. (1950): Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. I. Characters, distribution, and food plants. *Hilgardia* 19, 339–381.
- 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* 80, 53–58.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiology Methods* 14, 53–61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and 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 Phytopathological Society Japan* 33, 259–266.
- Ebbert, M.A., Jeffers, D.P., Harrison, H.A., Nault, L.R. (2001): Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101, 49–57.
- EPPO/CABI (1996): Apple proliferation phytoplasma. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford: CAB International. 959–962.
- EPPO/CABI (1997) *Quarantine Pests for Europe*. 2nd edition. Edited by Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M. CABI, Wallingford, UK, 1425 pp.
- EPPO (2015): PQR-EPPO database on quarantine pests. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm> [20.02.2015]
- Ermacora, P., Martini, M., Carraro, L., Ferrini, F., Loi, N. (2007): Behaviour and interaction of two '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' strains in artificial infections. *Bulletin of Insectology* 60 (2), 203–204.
- Errampalli, D., Fletcher, J., Claypool, P.L. (1991): Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease* 75, 579–584.
- Fialová, R., Navrátil, M., Válková, P. (2003): Phytoplasma occurrence on apple trees in Czech Republic. *Plant Protection Science* 39, 7–12.
- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Válková, P. (2008): Molecular tests to determine apple proliferation phytoplasma presence in psyllid vectors from apple tree orchards in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* 781, 471–475.

- Firrao, G., E. Gobbi, Locci, R. (1993): Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83 (6), 602–607.
- Firrao, G., Garcia Chapa, M., Marzachi, C. (2007): Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers Bioscience* 12, 1352–1375.
- Foerster, A. (1848): Uebersicht der Gattungen und Arten in der Familie der Psylliden. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande* 5, 65–98
- Fos, A., Danet, J.L., Zreik, L., Garnier, M., Bove, J.M. (1992): Use of monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease* 76, 1092–1096.
- Fránová, J., Petřík, K., Paprštejn, F., Kučerová, J., Růžicková, M. (2008): Molecular identification of phytoplasmas in cultivar collection and production plantations of apple and pear trees in the Czech Republic. *Acta Horticulturae (ISHS)* 781, 359–368.
- Fránová, J., Ludvíková, H., Paprštejn, F. (2011): Detection and characterization of phytoplasmas infecting apple trees in Czech Republic during 2010. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S51–S52.
- 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, 675–688.
- Fránová, J., Příbylová, J., Navrátil, M., Šafařová, D., Ember, I., Kölber, M., Cieslinska, M., Sůle, S., Kamińska, K. (2014): Phytoplasma diseases and their vectors in the Czech Republic, Hungary and Poland. Pp. 29–35. Bertaccini A. (ed.) *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*. COST Action FA0807. IPWG. Bologna, Italy.
- Freitag, J. H. (1964): Interactions and mutual suppression among three strains of aster yellows virus. *Virology* 24, 401–413.
- Frisinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M.S., Forti, D., Vindimian, M.E. (2000): *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology* 148, 425–431.
- Galetto, L., Bosco, D., Marzachi, C. (2005): Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of *flavescence dorée* (16Sr-V), *bois noir* (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology* 147, 191–201.
- Garcia-Salazar, C., Whalon, M.E., Rahardja, U. (1991): Temperature-dependent pathogenicity of the X-Disease mycoplasma-like organism to its vector: *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* 20, 179–84.
- Garnier, M., Foissac, X., Gaurivaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C., Bové, J.M. (2001): Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 324, 923–928.
- Germar, E. F. (1821) Bemerkungen über einige Gattungen der Cicadarien. *Magazin der Entomologie* 4, 1–106.
- Gold, R. E., Silvester, E. S. (1982): Pathogen strains and leafhopper species as factors in the transmission of western X-disease agent under varying light and temperature conditions. *Hilgardia* 50 (3), 1–43.
- Gross, J., Mekonen, N. (2005): Plant odours influence the host finding behaviour of apple psyllids (*Cacopsylla picta*; *C. melanoneura*). *IOBC-WPRS Bulletin* 28 (7), 351–355.
- Gross, J., Mayer, C. J. (2010): Nuove prospettive per il monitoraggio e la difesa biomolecolare. *Frutta e vite* 34 (1), 39–41.

- Gross, J., Mayer, C.J., Eben, A. (2011): Development of innovative methods for trapping of phytoplasma vectors by attractive infochemicals. *Bulletin of Insectology*, 64 (Supplement): S141–S142.
- 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.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35, 144–151.
- Guthrie, J.N., White, D.T., Walsh, K.B., Scott, P.T. (1998): Epidemiology of phytoplasma-associated papaya diseases in Queensland, Australia. *Plant Disease* 82, 1107–1111.
- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., Damak, S. (2002): Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology* 11, 97–103.
- Harrison, N.A., Bourne, C.M., Cox, R.L., Tsai, J.H., Richardson, P.A. (1992): DNA probes for detection of mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. *Phytopathology* 82, 216–224.
- Hegab, A.M., El-Zohairy, M.M. (1986): Retransmission of mycoplasma-like bodies associated with apple proliferation disease between herbaceous plants and apple seedlings. *Acta Horticulturae* 193, 343.
- Hobbs, H.A., Reddy, D.V.R., Reddy, A.S. (1987): Detection of a mycoplasma-like organism in peanut plants with witches' broom using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathology* 36, 164–167.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., Dickinson, M. (2008): Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1826–1837.
- Hodgetts, J., Tomlinson, J., Boonham, N., González-Martín, I., Nikolić, P., Swarbrick, P., Yankey, E.N., Dickinson, M. (2011): Development of rapid in-field loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 64, 41–2.
- Hodkinson, I. D. (2009): Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. *Journal of Natural History* 43 (1), 65–179.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S.; Kingdom, H.N., Namba, S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 4, 403–423.
- Horsfield, D. (1978): Evidence for xylem feeding by *Philaenus spumarius* (L.) (Homoptera: Cercopidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24, 95–99.
- Hoshi, A., Ishii, Y., Kakizawa, S., Oshima, K., Namba, S. (2007): Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of Insectology* 60, 105–107.
- Hren, M., Boben, J., Rotter, A., Kralj, P., Gruden, K., Ravnikar, M. (2007): Real-time PCR detection system for “*Flavescence dorée*” and “*Bois noir*” phytoplasma in grapevine: a comparison with the conventional PCR detection system and its application in diagnostics. *Plant Pathology* 56 (5), 785–796.
- Chen, K.H., Guo, J.R., Wu, X.J., Loi, N., Carraro, L., Guo, H.J., Chen, Y.D., Osler, R., Pearson, R., Chen, T.A. (1993): Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* 83, 915–922.

- Chen, K.H., Credi, R., Loi, N., Maixner, M., Chen, T.A., (1994): Identification and grouping of mycoplasma-like organisms associated with grapevine yellows and clover phyllody diseases based on immunological and molecular analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1905–1913.
- Chireceanu, C., Fătu, V. (2012): Data on the Hawthorn Psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Forster) Populations in Southeast Romania. *Ecologia Balkanica* 4 (2), 43–49.
- Christensen, N.M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schultz, A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17, 1175–1184.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schultz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with their hosts. *Trend in Plant Science* 10, 526–535.
- iPhyClassifier, 2016. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi> [12.03.2016]
- IRPCM (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.
- Jagoueix-Eveillard, S., Tarendau, F., Guolter, K., Danet, J.L., Bové, J.M., Garnier, M. (2001): *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 225–233.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bove, 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.
- Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F. (1999a): Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasma in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology* 147, 47–54.
- Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C., Dosba, F. (1999b): Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant Pathology* 48, 283–287.
- Jarausch, W., Saillard, C., Héliot, 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, 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, 101.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G. (2004): Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation phytoplasmas. *Acta Horticulturae* 657, 409–413.
- Jarausch, B., Fuchs, A., Schwind, N., Krczal, G., Jarausch, W. (2007): *Cacopsylla picta* as most important vector for “*Candidatus* Phytoplasma mali” in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology* 60, 189–190.
- Jarausch, B., Jarausch, W. (2010): Psyllid vectors and their control. Pp. 250–271. Weintraub P.G., Jones P. (eds.) *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. CABI, London, UK.
- Jarausch, B., Schwind, N., Fuchs, A., Jarausch, W. (2011): Characteristics of the spread of apple proliferation by its vector *Cacopsylla picta*. *Phytopathology* 101, 1471–1480.
- Jarausch, W., Torres, E. (2014): Management of Phytoplasma-associated diseases. *Phytoplasmas and phytoplasma disease management*. Pp. 199–208. Bertaccini A. (ed.)

- Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact. COST Action FA0807. IPWG. Bologna, Italy.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Maas, J., Dally, E. L. (1998): Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 48, 269–277.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Valiunas, D., Alminaitė, A., Staniulis, J. (2002): New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology* 108, 507–517.
- Jomantiene, R., Davis, R.E. (2006): Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiology Letters* 255 (1), 59–65.
- Jomantiene, R., Zhao, Y., Davis, R.E. (2007): Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA Cell Biology* 26 (8), 557–564.
- Junqueira, A., Bedendo, I., Pascholati, S. (2004): Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological Molecular Plant Pathology* 65, 181–185.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Namba, S. (2009): Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiology Letters* 293 (1), 91–101.
- Kartte, S., Seemüller, E. (1991): Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. *Journal of Phytopathology* 131, 137–148.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., Sato, M. (2000): Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90, 909–14.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, B.C., Morris, T.J., Purcell, A.H. (1987): Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238, 197–200.
- Kirkpatrick, B.C. (1992): Mycoplasma-like organisms plant and invertebrate pathogens. *The Prokaryotes* 4, 4050–4067.
- Kison, H., Seemüller, E. (2001): Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149, 533–541.
- Krczal, G., Krczal, H., Kunze, L. (1988): *Fiebertiella florii* (Stål), a vector of apple proliferation agent. *Acta Horticulturae* 235, 99–106.
- 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.
- Kunkel, L.O. (1955): Cross protection between strains of aster yellow-type viruses. *Advances in Virus Research* 3, 251–273.
- Langer, M., Maixner, M. (2004): Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the Stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43, 191–199.
- Lauterer, P. (1999): Results of the investigation on Hemiptera in Moravia, made by the Moravian museum (Psylloidea 2). *Acta Musei Moraviae, Scientiae Biologicae* 84, 71–151.
- Lavigne, R. (1959): Biology of *Philaenus leucophthalmus* (L.). *Journal of Economic Entomology* 52, 904–907.

- Lavina, A., Sabate, J., Batlle, A. (2011): '*Candidatus* Phytoplasmas mali': identification of potential insect vectors in apple orchards of Spain. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S125–S126.
- Lee, I.M., Davis, R.E. (1986): Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annual Review of Phytopathology* 24, 339–354.
- Lee, I.-M., Davis, R.E. (1988): Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. *Plant-Microbe Interactions* 1, 303–310.
- Lee, I.M., Davis, R.E. (1992): Mycoplasmas which infect plants and insects. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Pp: 379–390. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- Lee I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen, D.E. (1993a): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834–842.
- Lee, I.-M., Davis, R. E., Hsu, H.-T. (1993b): Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organisms strain cluster by serological assays with monoclonal antibodies. *Plant Disease* 77, 815–817.
- Lee, I.-M., Gundersen, D.E., 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., Tiffany, M., Gundersen, D. E., Klopmeier, M. (1995): Phytoplasma infection: A beneficial factor for production of commercial branching poinsettia cultivars? *Phytopathology* 85, 1179.
- Lee, I.-M., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Bartoszyk, I.M. (1996): Multiple phytoplasmas detected in two species of Homoptera feeding on pear trees with decline symptoms. *The International Organization for Mycoplasma* 4, 199.
- Lee, I.-M., Klopmeier, M., Bartoszyk, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Chou, T., Thomson, K.L., Eisenreich, R. (1997): Phytoplasma induced free-branching in commercial poinsettia cultivars. *Nature Biotechnology* 15, 178–182.
- 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., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54, 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, 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., 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 (2), 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 (2), 87–91.
- Lefol, C., Caudwell, A., Lherminier, J., Larrue, J. (1993): Attachment of the *Flavescence dorée* pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of Applied Biology* 123, 611–22.

- Lemmetty, A., Tuovinen, T., Kemppainen, R. (2011): '*Candidatus* Phytoplasma mali' infected *Cacopsylla picta* found in apple orchards in South-Western Finland. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S257–S258.
- 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* 10, 1376.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., Seemüller, E. (1999): Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological Molecular Plant Pathology* 55, 59–68.
- Lešnik, M., Ravnikar, M., Brzin, J., Mehle, N., Petrovič, N., Tojnko, S., Lešnik, M. (2007): Expression of disease symptoms on different apple cultivars infected with apple proliferation phytoplasma. *Hmeljarski bilten* 14, 43–53.
- Lherminier, J., Prensier, G., Boudon-Padiou, E., Caudwell, A. (1990): Immunolabeling of grapevine *Flavescence dorée* MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38, 79–86.
- Liefting, L. W., Andersen, M. T., Beever, R. E., Gardner, R. C., Foster, L. S. (1996): Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3133–3139.
- Lim, P.O., Sears, B.B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 171, 5901–5906.
- Lim, P.O., Sears, B.B. (1991): The genome size of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism resembles those of animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* 173, 2128–2830.
- Linnæus, C. (1758): *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata. Pp. [1–4], 1–824. Holmiæ. (Salvius).
- 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 (7), 771–776.
- Ludvíková, H., Lauterer, P., Suchá, J., Fránová, J., Bertaccini, A., Maini, S. (2011): Monitoring of psyllid species (Hemiptera, Psylloidea) in apple and pear orchards in East Bohemia. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S121–S122.
- MacLeod, A., Anderson, A., Follak, S., van der Gaag, D.J., Potting, R., Pruvost, O., Smith, J., Steffek, R., Vloutoglou, I., Holt, J., Karadjova, O., Kehlenbeck, H., Labonne, G., Reynaud, P., Viaene, N., Anthoine, G., Holeva, M., Hostachy, B., Ilieva, Z., Karssen, G., Krumov, V., Limon, P., Meffert, J., Niere, B., Petrova, E., Peyre J., Pfeilstetter E., Roelofs W., Rothlisberger F., Sauvion N., Schenck N., Schrader, G., Schroeder, T., Steinmoller, S., Tjou-Tam-Sin, L., Ventsislavov, V., Verhoeven, K., Wesemael, W. (2012): Pest risk assessment for the European Vommunity plant health: a comparative approach with case studies. Supporting Publications 2012: <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/doc/319e.pdf> [12.02.2015]
- Madden, L.V., Nault, L.R., Heady, S.E., Styer, W.E. (1984): Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of Dalbulus leafhopper vectors. *Annals of Applied Biology* 105, 431–41.
- Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A., Nicolaisen, M. (2012): DNA barcoding for identification of "*Candidatus* Phytoplasmas" using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS ONE* 7, 12.

- Maramorosch, K. (2008): The discovery of phytoplasmas: a historical reminiscence of success and failure. *Egyptian Journal of virology* 5 (1), 1–19.
- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89 (9), 805–810.
- Marcone, C., Lee, I.-M., Davis, R. E., Ragozzino, A., Seemüller, E. (2000): Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 50, 1703–1713.
- Marcone, C., Jarausch, B., Jarausch, W. (2010): ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1), 19–34.
- Margaria, P., Palmano, S. (2013): Reverse transcription-PCR for phytoplasma detection utilizing crude sap extraction. *Methods in Molecular Biology* 938, 283–289.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P.A., Benedetti, R., Bertaccini, A. (2002): Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular probes* 16 (3), 197–208.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K.D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N.A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, J., Osler, R. (2007): Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2037–2051.
- 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., Ferrini, F., Danet, J.L., Ermacora, P., Sertkaya, G., Delić, D., Loi, N., Foisacc, X., Carraro, L. (2010): PCR/RFLP based method for molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ strains using *aceF* gene. *Julius-Kühn-Archiv* 427, 386–391.
- Marzachi, C., Verati, F., Bosco, D. (1998): Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology* 133, 45–54.
- Marzachi, C., Milne, R.G., Bosco, D. (2004): Phytoplasma-plant-vector relationship. *Recent research development in plant pathology* 3, 211–241.
- 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.
- Maust, B.E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J.M., Oropeza, C. (2003): Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93 (8), 976–981.
- Mayer, C. J., Gross, J. (2007): Different host plant odours influence migration behaviour of *Cacopsylla melanoneura* (Förster), an insect vector of the apple proliferation phytoplasma. *IOBC-WPRS Bulletin* 30 (4), 177–184.
- Mayer, C. J., Vilcinskas, A., Gross, J. (2008a): Pathogeninduced release of plant allomone manipulates vector insect behaviour. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1518–1522.
- Mayer, C. J., Vilcinskas, A., Gross, J. (2008b): Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of Chemical Ecology* 34, 1045–1049.
- Mayer, C. J., Vilcinskas, A., Gross, J. (2010): Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agricultural and Forest Entomology* (doi:10.1111/j:1461-9563).

- Mayer, C. J., Vilcinskas, A., Gross, J. (2011): Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agricultural and Forest Entomology* 13, 25–35.
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowskyi, L.N., Cousin, M.T., Dale de Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Shina, R.H., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E. (1989): Plant Diseases Associated with Mycoplasma-like Organisms. *The Mycoplasmas* 5, 545–640.
- Mehle, N., Ambroziè Turk, B., Brzin, J., Nikolic, P., Dermastia, M., Boben, J., Ravnikar, M. (2010): Diagnostics of fruit trees phytoplasmas - the importance of latent infections. *Julius Kühn-Archiv* 427, 412–414.
- Mehle, N., Ravnikar, M., Knapic, V., Dermastia M. (2011): The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes* 1 (2), 65–76.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J. (2003): Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology* 4, 109–114.
- Moser, M., Musetti, R., Velasco, R., Jarausch, W. (2011): Gene expression analysis and cytochemical investigations in ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’-resistant and -susceptible *Malus* genotypes grown in vitro. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S161–S162.
- Munding, F. G. (1946): The control of spittle insects in strawberry plantings. *Journal of Economic Entomology* 39, 299–305.
- Murrall, D.J., Nault, L.R., Hoy, C.W., Madden, 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, 1223–32.
- Musetti, R., Favali, M.A., Pressacco, L. (2000): Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 133–147.
- Musetti, R., Sanita’ Di Toppi, L., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M.A., Osler, R. (2005): Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112, 53–61.
- Musetti, R., Paolacci, A.R., Ciaffi, M., Tanzarella, O.A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., Osler, R. (2010): Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* 100, 390–399.
- 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.
- Nagaich, B.B., Puri, B.K., Sinha, R.C., Dhingra, M.K., Bhardwaj, V.P. (1974): Mycoplasma-like organisms in plants affected with purple top-roll, marginal flavescence and witches’ broom diseases of potatoes. *Journal of Pathology* 81, 273–379.
- Nakashima, K., Hayashi, T. (1995): Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Japanese Journal of Phytopathology* 61, 451–55.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H., Tsuchizaki, T. (1993): Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83, 786–791.

- Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Fránová, J., Voráčková, Z., Karešová, R. (1998): Occurrence of fruit tree phytoplasmas in the Czech Republic. Pp. 100–102. Proceedings of XIV. Slovak and Czech Plant Protection Conference, Nitra, 1997.
- Neimark, H.C., Kirkpatrick, B.C. (1993): Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Molecular Microbiology* 7, 21–28.
- Németh, M. (1986): Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff Publishers, Budapest, Hungary. 841 pp.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, 27–29.
- Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y., Namba, S. (2011): Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE* 6 (8), e23242.
- Osler, R., Ermacora, P., Loi, N., Cararro, L., Ferrini, F., Refatti, E. (2001): Control strategies of Apple proliferation, a serious disease occurring both in Slovenia and in Italy. Pp. 238–243. Proceedings of the 5th Slovenian Conference on Plant Protection, Catez ob Savi, Slovenia, 6–8 March 2001.
- Ouvrard, D. (2014): Psyllid - The World Psylloidea Database. <http://www.hemiptera-databases.com/psyllid> [12.02.2015]
- Padovan, A.C., Gibb, K.S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, R.E., Magarey, P.E., Sears, B.B. (1995): Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grape vine yellows phytoplasma from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 25–31.
- Power, A.G. (1992): Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. *Ecological Entomology* 17, 63–68.
- Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A., Hernould, M. (2006): Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-microbe Interactions* 19 (1), 62–68.
- Purcell, A.H. (1982): Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 20, 397–417.
- Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y. (1998): Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1094–1156.
- Rui, D., Ciferri, R., Refatti, E. (1950): La virosi degli "scopazzi del melo" nel Veronese. *Notiziario delle Malattie delle Piante* 13, 7–11.
- Seemüller, E., Kunze, L., Schaper, U. (1984): 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. (1990): Apple proliferation. *Compendium of apple and pear diseases*. Pp. 67–68. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Seemüller, E., Kison, H., Lorenz, K.H. (1998a): On the geographic distribution and prevalence of the apple proliferation phytoplasma in lowintensity orchards in Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 105 (4), 404–410.
- Seemüller, E., Kison, H., Lorenz, K.-H., Schneider, B., Marccone, C., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1998b): Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Pp. 56–66. Manceau C., Spak

- J. (eds.). COST 823 New technologies to improve phytodiagnosis. Advances in the detection of plant pathogens by polymerase chain reaction. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Seemüller, E. (2002): Apple proliferation: etiology, epidemiology and detection. *ATTI Giornate Fitopatologiche* 1, 3–6.
- 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, 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.
- Seemüller, E., Moll, E., Schneider, B. (2007): *Malus sieboldii*-based rootstocks mediate apple proliferation resistance to grafted trees. *Bulletin of Insectology* 60 (2), 301–302.
- 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., Kampmann, M., Kiss, E., Sule, S., Schneider, B. (2011): Molecular differentiation of severe and mild strains of '*Candidatus* Phytoplasma mali' and evidence that their interaction in multiply infected trees determines disease severity. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement), S163–S164.
- Seidl, V., Komárková, V. (1972): Contribution on etiology, chemotherapy and transmission of proliferation of apple-tree. *Ochrana rostlin (Praha)* 8, 43–46.
- Seidl, V. (1980): Some results of several years' study on apple proliferation disease. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 15, 241–245.
- Severin, H.H.P. (1946): Longevity, or life histories, of leafhopper species on virusinfected and on healthy plants. *Hilgardia* 17, 121–33.
- Schaff, D.A., Lee, I.-M., Davis, R.E. (1992): Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochemistry Biophysics Research Communications* 186, 1503–1509.
- Schlesingerová, G. (2011): '*Candidatus* Phytoplasma mali' - Proliferační jabloně. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E. (1993): Classification of plantpathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 139, 519–527.
- Schneider, B., Seemüller, E. (1994): Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied and Environmental Microbiology* 141, 173–185.
- 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 Mycoplasma* 1, 369–380.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381–3389.
- Schneider, B., Seemüller, E. (2009): Strain differentiation of '*Candidatus* Phytoplasma mali' by SSCP and sequence analyses of the *hflB* gene. *Journal of Plant Pathology* 91, 103–112.
- Schuch, K. (1962): Diagnostic importance of stipules in apple proliferation. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)* 14, 85–88.
- 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, 2988–3033.
- Stål, C. (1864): Hemiptera mexicana enumeravit speciesque novas descripsit. (Continuatio). *Entomologische Zeitung*. Herausgegeben von dem entomologischen Vereine zu Stettin 25, 49–86.
- Suchá, J., Chroboková, E., Vávra, R., Navrátil, M., Lauterer, P. (2015): Hodnocení rizika šíření fytoplazmové proliferace jabloně při přechodu na organickou produkci. *Časopis profesionálních zahradníků. Zahradnictví*, 12/2015.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., Namba, S. (2006): Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 103 (11), 4252–4257.
- Swenson, K. G. (1974): Host plants and seasonal cycle of a leafhopper *Fieberiella florii* in Western Oregon. *Journal of Economic Entomology* 67 (2), 299–300.
- Šafařová, D., Zemánek, T., Válková, P., Navrátil, M. (2016a): ‘*Candidatus Phytoplasma cirsii*’, a novel taxon from Creeping thistle (*Cirsium arvense* (L.) Scop.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (doi: 10.1099/ijsem.0.000937).
- Šafařová, D., Starý, M., Válková, P., Opatíková, M., Bílková, L., Navrátil, M. (2016b): *Phytoplasma* infection risk in apple orchards. *Horticultural Science* (v tlači).
- Tedeschi, R., Bosco, D., Alma, A. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95, 544–551.
- 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, 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, 301–310.
- Tedeschi, R., Baldessari, M., Mazzoni, V., Trona, F., Angeli, G. (2012): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae) in Northeast Italy and its role in apple proliferation epidemiology in apple orchards. *Journal of Economic Entomology* 105 (2), 322–328.
- Todd, J.L., Harris, M.O., Nault, L.R. (1990): Importance of color stimuli in host-finding by *Dalbulus* leafhoppers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54, 245–50.
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M.J., Boonham, N. (2010): Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology* 100, 143–149.
- Tsai, J. H. (1979): Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. *The Mycoplasmas III, Plant and Insect Mycoplasmas*, 265–307.
- USDA (2012): New Pest Response Guidelines. Selected ‘*Candidatus Phytoplasma* spp.’ of Apple, Grape and Peach https://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/emergency/downloads/nprg-phytoplasma.pdf [14.02.2016]
- Valiunas, D., Stanulis, J., Davis, R.E. (2006): ‘*Candidatus Phytoplasma fragariae*’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria × ananassa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 277–281.

- Van Steenwyk, R. A., Havens, D. M., Freeman, R. (1990): Evaluation of trap types for two vectors of western X-Disease: *Colladonus montanus* and *Fieberiella florii* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economical Entomology* 83, 2279–2283.
- Vega, F.E., Davis, R.E., Barbosa, P., Dally, E.L., Purcell, A.H., Lee, I.-M. (1993): Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83, 621–624.
- Vega, F.E., Davis, R.E., Dally, E.L., Barbosa, P., Purcell, A.H., Lee, I.-M. (1994): Use of a biotinylated DNA probe for detection of the aster yellows mycoplasma-like organism in *Dalbulus maidis* and *Macrostelus fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae) *Florida Entomologist* 77, 330–334.
- Weaver, C. R., King, D. R. (1954): Meadow spittlebug *Philaenus leucophthalmus* (L.). Ohio Agricultural Experiment Station Research Bulletin 741, 1–99.
- Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R. E., Suo, X., Zhao, Y. (2008): Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2368–2377.
- Weintraub, P. G., Beanland, L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51, 91–111.
- Weintraub, P. G. (2007): Insect vectors of phytoplasmas and their control - an update. *Bulletin of Insectology* 60 (2), 169–173.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E. (2009): Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2582–2593.
- Zreik, L., Carle, P., Bové, J.M., Garnier, M. (1995): Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 449–453.