

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

**Detekce fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' metodou dřevinných
indikátorů**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

Mgr. Radoslav Vlk, Ph.D.

Vypracovala

Bc. Kamila Blahová

Lednice 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Detekce fytoplazmy ‘Candidatus Phytoplasma mali’ metodou dřevinných indikátorů, vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne 8. 5. 2016

Děkuji vedoucímu diplomové práce Mgr. Radoslavu Vlkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval v průběhu zpracování této diplomové práce. Poděkování dále patří Ing. Janě Suché a Ing. Stanislavu Bočkovi, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a vysvětlení uvedené problematiky.

Obsah

Seznam obrázků, tabulek a grafů

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce	11
3. Současný stav řešené problematiky.....	12
3.1 Fytoplazma ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	12
3.2 Hostitelské rostliny.....	12
3.3 Příznaky napadení chorobou proliferace jabloně	12
3.4 Faktory ovlivňující šíření patogenu.....	13
3.5 Geografické rozšíření fytoplazmy	15
3.5.1 Výskyt fytoplazmy v České republice	15
3.5.2 Výskyt fytoplazmy v Evropě.....	16
3.5.3 Výskyt fytoplazmy ve světě	17
3.6 Metody testování fytoplazmy.....	17
3.6.1 Metody testování fytoplazmy pomocí laboratorních technik.....	18
3.6.2 Metody testování fytoplazmy pomocí dřevinných indikátorů	19
3.6.3 Způsoby očkování	21
3.6.4 Faktory ovlivňující koncentraci fytoplazmy v rostlině	21
3.6.5 Výhody a praktické uplatnění biologického testování	22
3.6.6 Použití biologického testování pro detekci fytoplazmy	23
3.6.7 Uplatnění biologického testování v diplomové práci.....	23
4. Materiál a metodika.....	25
4.1. Pokusná plocha.....	25
4.2 Použitý rostlinný materiál	25
4.2.1 Indikátorová odrůda ‘Golden Delicious’	26
4.2.2 Testovaná odrůda ‘Boskoopské’	27
4.2.3 Testovaná odrůda ‘Ribstonské’	28
4.2.4 Testovaná odrůda ‘Gascoigneho šarlatové’	28
4.2.5 Testovaná odrůda ‘Kanadská reneta’	29
4.2.6 Testovaná odrůda ‘Panenské české’	29
4.2.7 Podnožová odrůda ‘Jadernička Moravská’	30
4.3 Metodika.....	30
4.3.1 Založení experimentu.....	30

4.3.2. Použité postupy očkování	31
4.3.3. Použité postupy roubování	31
4.3.4. Použité metody testování	32
4.3.5 Metodický postup pro ošetřování testovaných rostlin během vegetace ..	36
4.4 Ověření přítomnosti fytoplazmy v testovaných rostlinách pomocí molekulární metody real-time PCR.....	37
5. Výsledky	39
5.1 Označení rostlin	39
5.2 Úspěšnost inokulace	39
5.3 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 1	40
5.4 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 2	40
5.5 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 3	41
5.6 Výsledky testování přítomnosti fytoplazmy v pokusných rostlinách pomocí molekulárních metod.....	41
5.7 Porovnání jednotlivých metod	47
6. Diskuze	49
7. Závěr	52
8. Souhrn a Resume	53
9. Seznam použité literatury a elektronických zdrojů	56
10. Seznam použitých zkratk	63
Přílohy	

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázky:

- Obr. 1 Geografická poloha testovaných odrůd 'Boskoopské', 'Ribstonské', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneho' a 'Panenské české'..... 27
- Obr. 2 Podvojně roubování testované odrůdy 'Ribstonské' a indikátoru Vf 'Golden Delicious' na semenáč.....33
- Obr. 3 Letní očkování testované odrůdy 'Ribstonské' na indikátor Vf 'Golden Delicious' roubovaný v zimě na semenáč.....35
- Obr. 4 Dvojitě letní očkování indikátoru Vf 'Golden Delicious' a testované odrůdy 'Ribstonské' na semenáč.....36
- Obr. 5 Metoda dvojitě letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč.....37
- Obr. 6 Graf změn fluorescence v závislosti na počtu amplifikačních cyklů, z nějž lze hledané hodnoty koncentrací fytoplazem ve vzorcích vypočíst (pomocí připojeného počítače).....39

Tabulky:

- Tab. 1 Jednotlivé varianty použitých metod a experimentálních testovaných rostlin.....32
- Tab. 2 Zkratky používané pro označení celých názvů odrůd v průběhu hodnocení výsledků.....40
- Tab. 3 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy 'Panenské české'43
- Tab. 4 Srovnání výsledků hodnocení výskytu '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy 'Boskoopské'44
- Tab. 5 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy

	'Ribstonské'	45
Tab. 6	Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ' pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy 'Kanadská reneta'	46
Tab. 7	Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ' pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy 'Gascoigne'	47
Grafy:		
Graf 1	Úhrn teplot a srážek za období od 1. 6. 2015 do 31. 1. 2016	26

1. Úvod

Neodmyslitelnou součástí nejen venkovské, ale i městské krajiny jsou ovocné stromy. Ovocné kultury se vyskytují v našich regionech již od středověku, o čemž vypovídá i velký počet starých a krajových odrůd. Častokrát vznikly náhodně a u většiny z nich neznáme původ. Mezi jejich přednosti se řadí nejen dokonalá přizpůsobivost k půdním a klimatickým podmínkám, ale i odolnost k celé řadě škodlivých činitelů. V současnosti se mnohé z těchto odrůd jeví zajímavě ve šlechtitelských programech jako donory rezistence (odolnost vůči chorobám, nízké teplotě, zamokření, zasolení, suchu apod.) (ŘEZNÍČEK, 1991).

Přestože v Evropě existují desítky různých starých a krajových odrůd jabloní, pouze některé z nich byly záměrně využity ve šlechtění. A to i navzdory skutečnosti, že mohou mít vynikající nutriční a technologické vlastnosti, většina z nich jsou jen místního významu. Nicméně jejich genetická jedinečnost představuje nezastupitelné ekologické bohatství, a proto by se tyto staré a krajové odrůdy mohly stát novým a vynikajícím zdrojem potravin a živin (například odrůda 'Citronové zimní' obsahuje vysoké množství kyselin, odrůda 'Strymka' pektinů, odrůda 'Boikovo' draslíku). Mohly by být použity nejen k přímé spotřebě a v potravinářském průmyslu, ale také jako potenciální výběrový a množitelský materiál (BALÍK *et al.*, 2013).

Z botanického hlediska patří jabloně (rod *Malus* MILL.) do řádu růžokvětých (*Rosales*), čeledě růžovitých (*Rosaceae*) a podčeledě jabloňovitých (*Maloideae*). Na vzniku evropských odrůd se podílely hlavně botanické druhy *Malus sylvestris* (L.) Mill., *Malus pumila* Mill., *Malus prunifolia* Borkh., *Malus baccata* (L.) Borkh. a *Malus floribunda* Sieb. (RICHTER, 2004).

Jednou z nejvýznamnějších chorob jabloní je v současnosti proliferace jabloně (Apple proliferation), jejímž původcem je fytoplazma 'Candidatus Phytoplasma mali', která byla zařazena mezi regulované škodlivé organismy. V souladu s hlavními záměry Evropského společenství by měly být vyvinuty nové strategie pro udržitelné řízení výskytu této choroby jádřovin (BULGARI *et al.*, 2012; SEEMÜLLER *et* SCHNEIDER, 2004).

'Candidatus Phytoplasma mali' jsou jednoduché prokaryotní organismy bez pevné buněčné stěny. Částice fytoplazmy se v jabloních nacházejí v cévních svazcích (v sítkovicích lýka) a jsou v různých částech rostliny rozšířeny nerovnoměrně. Koncentrace fytoplazmy v nadzemní i podzemní části jabloně v průběhu roku kolísá.

V nadzemní části je nejvyšší zpravidla ke konci vegetačního období a vyskytuje se prakticky ve všech výhonech a listech, v jednotlivých výhonech však množství fytoplazem nejsou stejná (SCHLESINGEROVÁ, 2011).

Prvním příznakem onemocnění může být červeně zbarvené listy v období od konce léta do poloviny podzimu, přitom tyto listy výrazně kontrastují s podzimními žlutě zbarvenými listy zdravých stromů.

V červenci nebo v srpnu následujícího roku mohou příznakové stromy tvořit metlovité výhony (Přílohy, Obr. 7 a Obr. 8), což je typický a nejviditelnější příznak tohoto onemocnění. Nové metlovité výhony začínají prorůstat obvykle v druhé polovině vegetace. Dalším typickým příznakem napadení jsou zvětšené palisty (Přílohy, Obr. 9) především u mladých výhonů (SEIDL, 1966; SEEMÜLLER *et al.*, 2011).

Fytoplazmy se lépe množí při nižších teplotách, a proto vysoké letní teploty jejich koncentraci v pletivech nadzemních částí snižují. V zimním období, v souvislosti s degradací floému, množství fytoplazem v nadzemních částech klesá. V období dormance se koncentrují v podzemní části. S nástupem vegetace dochází k reinvazi z kořenů zpět do nadzemních částí.

Skutečnost, že množství fytoplazem v nadzemních částech rostlin kolísá, výrazně ovlivňuje možnosti jejich detekce. Jednou z nejdůležitějších podmínek úspěšné detekce fytoplazem je správný termín odběru vzorků. Pro potvrzení přítomnosti fytoplazem v rostlině lze využít mikroskopické techniky (elektronová a fluorescenční mikroskopie, molekulární metody) nebo biologické testy (metoda dvojitého očkování) (ZAWADZKA *et KAMINSKA*, 1973; CARRARO *et al.*, 1988; SCHLESINGEROVÁ, 2011).

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce byla optimalizace postupu detekování fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*‘ pomocí dřevinných indikátorů pro rutinní použití jako alternativy k molekulárním metodám, založeným na principu PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce).

Stěžejním cílem této práce bylo porovnání tří různých způsobů testace rostlin v rámci založeného experimentu. U každého způsobu (metody) byla založena *negativní kontrola*: samotný indikátor naroubovaný nebo naočkovaný na podnož (v několika opakováních). Porovnání kontrolních rostlin (*negativních kontrol*) s testovacími rostlinami umožnilo hodnocení přítomnosti příznaků fytoplazmového onemocnění (změněné zúžené prodloužené chlorotizované palisty apod.).

Vzhledem k tomu, že bylo období provádění studie pro účely diplomové práce časově omezené, bylo zjišťováno, zda přítomnost příznaků na rostlinách může nastat již během rašení a krátce po něm. Dalším cílem bylo zjistit, zda lze hodnotit rostliny již několik měsíců po inokulaci (jak je tomu u indexingu některých virových chorob ovocných plodin), a zda lze dosáhnout konečných výsledků testování urychlením rašení a růstu ve skleníkových podmínkách.

Příznaky byly pozorovány na rostlinách během rašení roubu nebo očka indikátoru. Hodnocení přítomnosti příznaků bylo prováděno v pravidelných intervalech. Záměrem studie bylo také vyhodnotit, zda je fytoplazma detekovatelná biologickým indexem v letním očku nebo zimním roubu (vliv vnějších teplot a vegetační fáze rostliny).

Dalším cílem této práce bylo sledování a hodnocení případného výskytu příznaků fytoplazmového onemocnění na rostlinách od začátku rašení v pravidelných intervalech.

Vzhledem k předpokladu, že během období prováděné studie nemusí dojít k plnému rozvinutí příznaků, bylo několik rostlin indikátorů otestováno ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích s.r.o. pomocí molekulárních metod PCR (real-time PCR), což umožnilo ověřit přítomnost fytoplazmy v indikátoru jinou metodou. Získané výsledky sloužily jako podklad pro vyhodnocení.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1 Fytoplazma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’

Proliferace jabloně (Apple proliferation, AP) způsobená fytoplazmou ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ je hospodářsky významné onemocnění postihující mnoho pěstitelských oblastí jabloní v Evropě (SEEMÜLLER *et* SCHNEIDER, 2004; BARIC *et al.*, 2011; ZIMMERMANN *et al.*, 2015). Toto onemocnění výrazně zhoršuje kvalitu ovoce a produktivitu stromů (KUBE *et al.*, 2008). Představuje monofyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes* (triviální název mykoplazma) a rodu ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (SCHLESINGEROVÁ, 2011). Z genetického hlediska je ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ charakteristická nízkým počtem guaninových a cytosinových bází (RAZIN, 1992). Práce KUBE *et al.* (2008) prokázaly, že fytoplazma má lineární chromozom.

Fytoplazma vykazuje dvojí životní cyklus. Rozmnožuje se jak ve floému hostitelské rostliny, tak v těle hmyzího vektoru. Membránové proteiny patogenu jsou v přímém kontaktu s oběma hostiteli a hrají klíčovou roli v jeho šíření (BOONROD *et al.*, 2012).

3.2 Hostitelské rostliny

Hlavní hostitelskou rostlinou fytoplazmy Apple proliferation je jabloň domácí (*Malus domestica*), ale napadá i jiné druhy rodu *Malus*, jako například *M. baccata*, *M. coronaria*, *M. domestica*, *M. floribunda*, *M. fusca*, *M. gloriosa*, *M. ionensis*, *M. platicarpa*, *M. purpurea* nebo *M. robusta* (NÉMETH, 1986).

Přítomnost fytoplazmy byla prokázána i v řadě dalších rostlin a dřevin. MARCONE *et al.* (1996) detekovali ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ v lísce (*Corylus spp.*), SELJAKB *et* RAVNIKARA (2007) v třešni ptačí (*Prunus avium*), meruňce obecné (*Prunus armeniaca*), slivoni švestce (*Prunus domestica*), MEHLE *et al.* (2007) v hrušni obecné (*Pyrus communis*).

3.3 Příznaky napadení chorobou proliferace jabloně

Příznaky napadení chorobou proliferace jabloně jsou značně variabilní a kolísají i jejich intenzita. Infekce se může projevit na celém stromě nebo jen na části koruny, může být také po dlouhou dobu latentní. Velmi častým příznakem je mírná chloróza listů, ve druhé polovině vegetace přecházející do červena. Typickým příznakem jsou zvětšené palisty, které mají charakter malého listu. Tento příznak se však projevuje jen u některých odrůd. Palisty jsou anatomicky rozděleny na řapík a čepel, čepel je malá, pravidelně ostře zoubkovaná, často zakulacená.

Dalším příznakem je prorůstání (proliferace) oček na silnějších letorostech včetně letorostů vyrůstajících ze starého dřeva. Boční výhony, které svým vzhledem připomínají metly, svírají s terminálním výhonem ostrý úhel. BLUMER *et* BOVEY (1957) ve své práci uvádějí příklady ze svých pokusů. U odrůdy 'Boskoopské' je odklon výhonu u zdravých stromů 50°, u nemocných 28°, u odrůdy 'Schneiderovo' je odklon u zdravých stromů 80°, u nemocných 30°.

Může docházet k pozdnímu a opakovanému kvetení (Přílohy, Obr. 10). Plody jsou malé, špatně vybarvené a s dlouhými stopkami. Nemocné stromy mají celkově slabší habitus (PEKÁRKOVÁ *et* RŮŽIČKA, 2013; ZIMMERMANN *et al.*, 2015). Jabloně se při mírné infekci mohou zregenerovat, ale ovoce již zůstává poddimenzované, silně napadené stromy usychají (EPPO, 2015). SEIDL (1973) ve své práci uvedl, že u proliferovaných jabloní k trvalému zlepšení úrodnosti nedochází, že k němu dochází jen ve vyjimečných případech a v ojedinělých letech. Celková úrodnost nemocných stromů v období plné plodnosti je podstatně nižší než u zdravých stromů, takže je rozhodně účelné nemocné stromy odstranit.

3.4 Faktory ovlivňující šíření patogenu

Fytoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*' není přenosná mechanicky, semeny či pylem (SCHLESINGEROVÁ, 2011). Její šíření zabezpečují hmyzí přenašeči, a to především mery a křísy. Mezi nejvýznamnější přenašeče ze skupiny mer řadíme mery rodu *Cacopsylla*, konkrétně meru černožilnou (*Cacopsylla melanoneura*) (MALAGNINI *et al.*, 2010) a meru jabloňovou *Cacopsylla picta* (JARAUSSCH *et al.*, 2003). V některých částech Evropy je také významným přenašečem křísek trnkový (*Fieberiella florii*) (TEDESCHI *et* ALMA, 2006).

U kulturních rostlin je přenašečem především člověk, a to prostřednictvím vegetativně množeného materiálu (oček, roubů) (SCHLESINGEROVÁ, 2011). SCHNEIDER *et al.* (2014) studovali antagonistické interakce mezi jednotlivými různě virulentními kmeny fytoplazmy. Výzkum byl prováděn na pokusných rostlinách vytrvalé byliny barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*). Výsledky byly pozitivní u 13% vzorků *Catharanthus roseus* odebraných ze stonku a u 27% vzorků *Catharanthus roseus* odebraných z kořene.

Cacopsylla picta a *Cacopsylla melanoneura*, jako vektoři proliferace jabloně, jsou charakterističtí perzistentním přenosem patogenu. Na jaře se přezimující dospělci stěhují ze svých zimovišť zpět do ovocných sadů. *Cacopsylla picta* je monofágní druh

žijící na jabloních (*Malus* spp.) a je rozšířena pouze v Evropě. Na jaře (od konce března do začátku dubna) se *Cacopsylla picta* vrací ze svých zimovišť zpět na jabloně, kde klade vajíčka. Jedinci nové generace žijí na jabloních až do začátku července, kdy je opouštějí jako dospělci a migrují do svých zimních stanovišť na jehličnaté stromy (MATTEDI *et al.*, 2006; TEDESCHI *et al.*, 2009).

Cacopsylla melanoneura je oligofágní druh žijící na rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*), především na hlohu (*Crataegus* spp.) a jabloni (*Malus* spp.). Životní cyklus je stejný jako u *Cacopsylla picta* s jediným rozdílem, že dospělci přilétají do sadů brzy na jaře. Zde stráví jen krátkou dobu svého životního cyklu. Dospělci nové generace bezprostředně po jejich vzniku (od poloviny května do poloviny června) migrují zpět do svých zimních stanovišť (MATTEDI *et al.*, 2006; MAYER *et* GROSS, 2007; CHIRECEANU *et* FĀTU, 2012).

V současné době jsou k dispozici jen omezené informace o interakci mezi hostitelskými rostlinami a živočišnými vektory. Ve studii MAYER *et al.* (2008) bylo prokázáno, že fytoplazma může změnit vůni své hostitelské rostliny (jabloně), která ovlivňuje chování vektora *Cacopsylla picta*. Nakažené stromy obsahují vyšší množství β -karotenu v porovnání s neinfikovanými jabloněmi. Mera, která nebyla v žádném kontaktu s infekcí, je více lákána těkavými látkami z infikovaných jabloní než z neinfikovaných. *Cacopsylla picta*, která se vyvinula na napadené rostlině, prokázala opačné chování. Tyto výsledky naznačují, že patogen může upravit vůni hostitelské rostliny, který dokáže větší měrou nalákat vektor na napadenou rostlinu. Následkem může být zvýšení přenosu onemocnění vektorovým hmyzem.

V roce 2006 byl proveden v severozápadní Itálii experiment s *Fiebertiella florii* jako přenašečem 'Candidatus Phytoplasma mali'. Hmyz byl odchycen pomocí žluté lepové desky. Základ experimentu spočíval v ověření hojnosti a infekčnosti kříisů v jabloňových sadech v porovnání s hojností v plané vegetaci obklopující jabloňové sady. Navzdory vysokému procentu infikovaných exemplářů získaných v jabloňových sadech (5,7 %) a v oblastech plané vegetace (20,0 %), riziko infekčnosti *Fiebertiella florii* v přírodě je pravděpodobně nízké, a to vzhledem k velmi nízké hustotě hmyzu. I přes nízký počet exemplářů byl tento experiment smysluplný, protože druh *Fiebertiella florii* je z epidemiologického hlediska zajímavý tím, že se jedná o polyfágní organismus, který je tedy případně schopný přenášet fytoplazmu i na jiné hostitelské rostliny (TEDESCHI *et* ALMA, 2006).

3.5 Geografické rozšíření fytoplazmy

3.5.1 Výskyt fytoplazmy v České republice

‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ byla na našem území poprvé diagnostikována v 60. letech 20. století (SCHLESINGEROVÁ, 2011).

V letech 2005–2006 se uskutečnily cílené průzkumy SRS (Pozn.: Instituce SRS byla od 1. ledna 2014 začleněna do ÚKZÚZ za podmínky novely zákona č. 147/2002 Sb. a zákona č. 326/2004 Sb.), zaměřené na možnost výskytu škodlivých organismů v České republice. Tyto průzkumy nebyly zaměřeny na testování jabloní na přítomnost ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ (SRS 2005; SRS, 2007).

V roce 2007 byl sledován výskyt fytoplazmy proliferace jabloně v rámci soustavné rostlinolékařské kontroly v ovocných školkách (celkem 156 kontrol, 42 odebraných vzorků, žádný zaznamenaný výskyt) a v rámci detekčního průzkumu v jabloňových sadech (celkem 126 kontrol, 5 odebraných vzorků, 4 vzorky pozitivní na AP). Průzkum se také prováděl v rozptýlené zeleni v krajině a ve veřejné zeleni. Přítomnost fytoplazmy byla zaznamenána na 4 místech (KVIČERA *et* NOVÁKOVÁ, 2008).

V roce 2009 bylo provedeno celkem 312 kontrol v místech produkce rostlin určených k pěstování (ovocné školky), kde byl odebrán celkem 1 vzorek, který byl negativní. V ostatních porostech hostitelských rostlin fytoplazmy bylo provedeno celkem 175 kontrol, při nichž bylo odebráno 11 vzorků. Sedm vzorků pozitivně reagovalo na infekci (STRACHOVÁ, 2010).

V průběhu roku 2010 byly z celého území České republiky shromážděny vzorky, které byly odebrány z příznakových jabloní, a to za účelem ověření přítomnosti fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. Pomocí molekulárních metod byla prokázána její přítomnost ve většině vzorků (90,12 %) (FRÁNOVÁ *et al.*, 2013).

V roce 2012 vykonala SRS při detekčním průzkumu 199 kontrol v produkčních výsadbách. Bylo odebráno celkem 56 vzorků. Výskyt fytoplazmy byl zjištěn na 10 místech. Současně bylo provedeno 366 kontrol, zaměřených na původce fytoplazmové proliferace jabloně v jabloňových školkách, přičemž výskyt tohoto patogenu nebyl zjištěn v žádné z nich (PEKÁRKOVÁ *et* RŮŽIČKA, 2013).

V roce 2013 bylo vykonáno při detekčním průzkumu celkem 187 kontrol. Celkem bylo testováno 45 odebraných vzorků. Výskyt AP byl potvrzen na 17 místech (RŮŽIČKA *et* PEKÁRKOVÁ, 2014).

Výsledky průzkumů v České republice v roce 2013, ale i v předcházejících letech

prokázaly, že původce fytoplazmové proliferace jabloně je na našem území značně rozšířen, a to především v sadech a veřejné zeleni. Výskyt v ovocných školkách nebyl potvrzen (KVIČERA *et* NOVÁKOVÁ, 2008; PEKÁRKOVÁ *et* RŮŽIČKA, 2013; RŮŽIČKA *et* PEKÁRKOVÁ, 2014).

ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský), sekce zemědělské inspekce, nařídil v roce 2014 celkem 35 rozhodnutí o mimořádných rostlinolékařských opatřeních v oblasti škodlivých organismů, mezi tyto rozhodnutí se řadí i rozhodnutí ve věci výskytu Apple proliferation phytoplasma (ÚKZÚZ, 2015).

Během mezinárodního průzkumu (průzkumu se zúčastnily státy: Rakousko, Německo, Švýcarsko, Itálie, Norsko a Česká republika) výskytu fytoplazmy v rozmnožovacím materiálu prováděného v rámci projektu ERA-NET Euphresco bylo zjištěno, že na monitorovaných ovocných stromech (matečných rostlinách) ze vzorků odebraných na území České republiky, byla, z celkem 474 odebraných vzorků pomocí molekulární metody nested PCR, prokázána přítomnost patogenu ve 13 vzorcích (2,7 %) Průzkumy na území České republiky probíhaly v letech 2012–2014 (CHRISTEN *et al.*, 2016).

3.5.2 Výskyt fytoplazmy v Evropě

V letech 2002 až 2007 byl v Německu, v severní Francii (Alsasku) a severním Švýcarsku (Aargau, Solothurn) proveden pokus, který byl zaměřen na rozšíření a míru infekčnosti mery *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura* v daných regionech. Experimentem byla prokázána přítomnost obou dvou druhů mery, ale pouze jednotlivci *Cacopsylla picta* byli vektorovými přenašeči onemocnění. V severním Německu byla nalezena infikovaná *Cacopsylla picta* ve všech jeho geografických oblastech. Přenosovými pokusy v laboratorních podmínkách bylo prokázáno, že pouze *Cacopsylla picta* je schopna přenášet patogen, zatímco *Cacopsylla melanoneura* neměla žádný význam jako vektor ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ ve studovaných regionech (JARAUSCH *et al.*, 2007).

Přítomnost ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ byla prokázána také v Itálii v regionu Friuli Venezia Giulia v letech 2004–2005 (MARTINI *et al.*, 2006), v severní Itálii v Trentinu v letech 1996–1998 (MATTEDI *et al.*, 2006) a v jižním Tyrolsku (OETTL *et* SCHLINK, 2015), v roce 2004 v jihozápadním Slovinsku (SELJAKB *et* RAVNIKARA, 2007) a v sedmi regionech Polska (CIEŚLIŃSKA *et* MORGAŚ, 2011). FRÁNOVÁ *et al.* (2014) ve své studii prokázali přítomnost infekce v Maďarsku a Polsku,

CHIRECEANU *et al.* (2012) v Rumunsku v oblasti Baneasa. V Norsku Úřad pro bezpečnost potravin (The Norwegian Scientific Committee for Food Safety) v sezóně 2010 registroval značný nárůst počtu detekcí Apple proliferation. Množství infikovaných stromů bylo v jabloňových sadech výrazně vyšší než v předchozích letech (SLETTEN *et al.*, 2011).

Výskyt fytoplazmy byl rovněž zaregistrován v Albánii, Anglii, Bosně a Hercegovině, Bulharsku, Finsku, Chorvatsku, Moldávii, Nizozemí, Řecku, Slovensku, Španělsku, Ukrajině, Belgii, Bulharsku, Rusku či Rakousku (EPPO, 2015).

3.5.3 Výskyt fytoplazmy ve světě

ZHAO *et al.* (2009) zkoumali *Tamarix chinensis* Lour. (tamaryšek čínský) v jeho přirozeném prostředí v Číně. Tamaryšek vykazoval výraznou metlovitost. Ve všech vzorcích, odebraných ze stonků a tkání listů příznakových stromů, byla zjištěna jedinečná genová sekvence fytoplazmy, a to 16S rRNA. Konkrétně byla zjištěna přítomnost taxonů ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ a ‘*Candidatus Phytoplasma spartii*’.

O výskytu onemocnění referují také zprávy z Asie, Indie, Jižní Afriky, Kanady, Nového Skotska, Sýrie a Turecka (EPPO, 2015). WOOD (1989) prokázal ve svém výzkumu přítomnost patogenu na Novém Zélandě.

3.6 Metody testování fytoplazmy

Jak již bylo dříve řečeno, proliferace jabloně (Apple proliferation) je onemocněním jabloně způsobené fytoplazmou ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. V nynější době není dosud známý žádný účinný prostředek přímé ochrany proti tomuto onemocnění. K zabránění jeho šíření je kladen důraz na zajištění preventivních opatření (BARIC *et al.*, 2008).

Základním preventivním opatřením je eliminace fytoplazem v rozmnožovacím materiálu jabloní. Tuto kontrolu zajišťuje tzv. certifikace rozmnožovacího materiálu. Používání certifikované sadby pro zakládání nových výsadeb je jedním z nejdůležitějších ochranných opatření. Dalším opatřením, které zabraňuje šíření fytoplazmového onemocnění, je odstraňování zdrojů infikovaných rostlin z porostů a jeho okolí (NAVRÁTIL *et al.*, 2008). Množitelské výsadby je nutno zakládat v oblastech pokud možno bez výskytu fytoplazem (BARIC *et al.*, 2008) v izolační vzdálenosti 250 metrů. Další možností ochrany stromů je zakládání rostlin jabloní s použitím rezistentních podnoží. V této oblasti stále probíhá výzkum, který přinesl zajímavé

výsledky probíhajícího šlechtění podnoží *M. sieboldii* a jejich kříženců (SCHLESINGEROVÁ, 2011).

Důležitá je také ochrana stromů prostřednictvím kontroly hmyzích vektorů v době jejich náletu do výsadeb ze zimních stanovišť. Lze provést ošetření pomocí insekticidů dle dostupných metodik. Termín a počet aplikací je závislý jak na množství týdenního záchytu, tak na počtu infikovaných jedinců (CARRARO *et al.*, 2008).

Tyto strategie však do značné míry závisí na efektivitě diagnostických nástrojů, které jsou charakteristické vysokou citlivostí a specifičností. Diagnostické metody navíc umožňují přímou detekci patogenu v rostlině nebo tkáni vektoru, vzhledem k nemožnosti rozmnožování jakékoliv fytoplazmy na kultivačním médiu (BARIC *et al.*, 2008).

3.6.1 Metody testování fytoplazmy pomocí laboratorních technik

Pro detekci '*Candidatus Phytoplasma mali*' mohou být použity různé diagnostické metody, jako například elektronová, fluorescenční a imunofluorescenční mikroskopie, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) či různé druhy PCR (Polymerase Chain Reaction) metody. Jeden z nedávno vyvinutých systémů pro diagnostiku '*Candidatus Phytoplasma mali*' je real-time PCR (real-time Polymerase Chain Reaction) metoda, která umožňuje kvantifikovat patogena v rostlinné tkáni. Zkouška se provádí v uzavřeném systému, čímž se urychluje čas analýzy a eliminuje se možnost přenosu znečištění. Real-time PCR metoda umožňuje sledovat amplifikace produktu v reálném čase a změny koncentrace PCR produktu lze měřit během jednotlivých cyklů reakce. V současné době tato metoda nejlépe splňuje nároky pro diagnostiku Apple proliferation (BARIC *et al.*, 2008; NAVRÁTIL *et FIALOVÁ*, 2008).

BRZIN *et al.* 2003 ve svém výzkumu použili metodu ELISA. Materiál byl odebrán v různém ročním období z rozdílných částí testovaných jabloní. Byly odebrány vzorky také například ze spících pupenů nebo z kořenové části. Ve své studii řešitelé hodnotili vhodné metody detekce '*Candidatus Phytoplasma mali*'. ELISA metoda byla porovnána s metodou PCR na 156 vzorcích jabloní z 33 různých odrůd. Cílem práce bylo vyvinout spolehlivé, relativně jednoduché a citlivé laboratorní postupy pro detekci '*Candidatus Phytoplasma mali*' na základě ELISA testů v kombinaci s PCR analýzou. Nejvyšší hodnoty byly získány z materiálu odebraného z letorostů, pak z listů a nakonec z kořenů. Technika byla úspěšně aplikována ve velkém objemu laboratorního testování. Měla by poskytnout rychlou a selektivní detekci patogenu, jak během pěstování, tak během období dormance.

Experimenty ukázaly, že díky metodě ELISA jde rozpoznat onemocnění nejen z materiálu odebraného z žilnatiny listů, ale také z letorostů a kořenů. ELISA v kombinaci s PCR analýzou umožňuje citlivou detekci ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, jak během aktivního růstu, tak v klidovém období. Výsledek testování by měl poskytnout cenný nástroj pro certifikační programy a epidemiologické studie v boji proti fytoplazmě (BRZIN *et al.*, 2003).

Na počátku 60. let 20. století byl v Maďarsku poprvé popsán výskyt Apple proliferation na jabloních. Od té doby bylo onemocnění zjištěno, na základě výsledků biologických testů, i v jiných částech země. Cílem jejich studie byla identifikace fytoplazem u příznakových jabloní, stejně jako potvrzení výskytu Pear decline (PD) u příznakových hrušní molekulárními metodami. S testováním probíhalo paralelně také testování pomocí dřevinných indikátorů. Z příznakových stromů z různých částí regionů byly v roce 2002 odebrány vzorky pro indexování. Apple proliferation byla zjištěna prostřednictvím dřevinného indikátoru Vf ‘Golden Delicious’, a to technikou očkování na kořen respektive podvojného očkování.

Ze vzorků z čerstvých, mražených nebo suchých tkání listů a mladých výhonů byly nukleové kyseliny izolovány chloroform-fenolovou metodou. Byla použita nested PCR s různými sadami primerů. Byl učiněn závěr, že molekulární metody byly vhodné pro identifikaci fytoplazem v několika příznakových jabloňových respektive hrušňových sadech. Molekulární i biologické metody byly vhodné pro detekci a identifikaci Apple proliferation na příznakových jabloních. Pear Decline nebyla zjištěna pomocí biologického testování (EMBER *et al.*, 2004).

3.6.2 Metody testování fytoplazmy pomocí dřevinných indikátorů

Biologický test pomocí dřevinného indikátoru jako ukazatele onemocnění je stále jeden z povinných kroků pro certifikaci ovocných dřevin. K testování fytoplazmy proliferace jabloně se používá nejčastěji viruprosté (Vf, virus free) rostliny ‘Golden Delicious’, který byl prokázán jako vysoce citlivý kultivar a reaguje na infekci proliferací výhonů (metlovitostí) (Přílohy, Obr. 8) a výrazně zvětšenými palisty (Přílohy, Obr. 9).

Aby se na indikátoru mohly projevit typické příznaky, je nutné, aby se patogen vyskytoval v dostatečném množství (kvantitě) v rostlině. Citlivé druhy či kultivary umožňují patogenu se ve svých pletivech dostatečně namnožit a dochází pak k projevu typických příznaků. U některých patogenů lze tohoto efektu dosáhnout u citlivých indikátorů za kratší období, u některých za delší. Významnou roli v tomto procesu hrají

těž vnější podmínky, zejména vnější teploty. Je známo, že u některých citlivých indikátorů lze testovat přítomnost testované rostliny za krátké období ve skleníkových podmínkách, kde však teploty nesmí dlouhodobě přesahovat 27 °C, aby nedošlo ozdravení či k potlačení patogena.

Některé indikátory a patogeny díky svým specifickým vlastnostem potřebují pro otestování polní podmínky a delší časový úsek. Metodiky doporučují AP testovat v polních podmínkách. Výsledek testování lze získat po minimálně dvou vegetačních obdobích, aby došlo k dostatečnému namožení patogenu. V rostlině může být přítomen ve velmi malém množství již v prvním roce, ale nedojde ještě k plnému rozvinutí typických symptomů. Jedním z cílů této studie bylo zjistit, zda lze urychlit ve skleníku. (EPPO, 1991; SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

Metoda biologického testování je založena na sledování viditelné reakce indikátorové rostliny (indikátoru) na uměle infikovaného patogena. Indikátorem je odrůda příslušného ovocného druhu, která je velmi citlivá vůči diagnostikovanému patogenu. Pro diagnostiku '*Candidatus Phytoplasma mali*' byly vyselektovány odrůdy 'Golden Delicious' a 'Boscoop', které jsou doporučovány metodikami EPPO. Další velmi citlivé indikátorové odrůdy jsou 'Lord Lambourne' (EPPO, 2001) a druh *Malus x dawsoniana* (MORVAN *et* CASTELAIN, 1975).

Biologické testování lze provádět v polních i skleníkových podmínkách. Pokud je prováděno ve skleníku, je nutné mít možnost regulovat vysoké teploty, které nebudou dosahovat hodnot vyšších než 27 °C. V jiném případě mohou být výsledky testování zkresleny působením vysokých teplot. Pro testování je nutné používat pouze podnože a indikátory se zdravotním statutem *virus free* (Vf) (SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

KARTTE *et* SEEMÜLLER v roce 1988 v Německu testovali 40 odrůd jabloní. Semenné rostliny byly inokulovány patogenem způsobujícím proliferaci jabloně. U všech taxonů testovaných odrůd byly ve větší či menší míře pozorovány změny, a to nejčastěji snížení velikosti listů, jejich žloutnutí a zbarvení do červena na konci léta. Zvětšené palisty a metlovitost, charakteristické příznaky nemoci, byly méně běžné. Úmrtnost stromů se pohybovala od několika procent až k téměř 100 procentům. Výjimku tvořily *Malus baccata*, *Malus pumila* 'Dartmouth', *Malus x purpurea* a *Malus sylvestris*, které se projeví jako tolerantní k onemocnění.

Biologický indexing fytoplazmových chorob pro účely certifikace rozmnožovacího materiálu je prováděn ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy

s.r.o. Testy jsou prováděny v polních podmínkách. Pro založení testovacích rostlin je používána **metoda dvojitého očkování (double budding)**. Na zdravou podnož je naočkováno jedno očko z indikátorové rostliny a pod ně očko z testovaného stromu. V roce následujícím po očkování se podnož nad očkem zakrátí řezem. Během pěstování je podporován bujný růst vrchního oka indikátoru. Spodní očko testované rostliny je udržováno. Vývoj prvních příznaků na indikátoru lze pozorovat již v prvním roce. Vzhledem k tomu, že má na vývoj patogena v indikátoru vliv mnoho faktorů, je doporučeno pozorovat rostliny minimálně dvě vegetační období následující po naočkování. Tím se zajistí možnost plného rozvoje onemocnění a lze pak testy vyhodnotit (SEIDL, 1966; EPPO, 2001; NAVRÁTIL *et* FIALOVÁ, 2008).

3.6.3 Způsoby očkování

Očkovat můžeme ve dvou obdobích. Podle doby očkování rozeznáváme očkování na bdící očko a očkování na spící očko. První období – v květnu až v červnu – je pro očkování méně obvyklé. Proběhne-li očkování v této době, očko ještě stihne vyrašit a vytvořit letorost. Tento způsob se nazývá očkování na očko bdící. Ve druhém období, od poloviny července do poloviny srpna, očkujeme na tzv. očko spící. Očko s podnoží sice sroste, ale vyraší až na jaře příštího roku (KYNCL, 1980; URBAN, 1986).

Po ukončení inkubační doby patogenu je stanovena, na základě viditelných typických příznaků, jeho přítomnost v indikátorové odrůdě (HUSS, 2001).

3.6.4 Faktory ovlivňující koncentraci fytoplazmy v rostlině

Na výskyt a koncentraci fytoplazmy v rozdílných částech rostliny a v různých obdobích roku má vliv mnoho faktorů (vnější podmínky, kmen či izolát fytoplazmy a jeho virulence, citlivost genotypu – odrůdy, druhu infikované rostliny atd.). Spoluúčinnost těchto vlivů se dosud nepodařilo zcela rozklíčovat. Většina vědeckých prací (SEIDL, 1966; SCHAPER *et* SEEMÜLLER, 1982) uvádí, že se fytoplazma vyskytuje v zimě hlavně v kořenech a odtud jsou nadzemní části rostliny rekolonizovány na jaře během rašení a fytoplazmy zde zůstávají až do konce vegetačního období. Z toho lze odvodit hypotézu, že letní očka dosahují vyšší pravděpodobnosti přítomnosti infekce než zimní rouby. Běžná praxe během kontroly zdravotního stavu i prováděné cílené průzkumy využívající stále citlivější molekulární diagnostiku PCR dokazují, že na přítomnost a koncentraci fytoplazmy v nadzemních částech rostlin má zřejmě značný vliv průběh vnějších teplot, a to během celého roku. To znamená, že jakékoliv extrémní teploty, ať už vysoké či nízké, mohou zapříčinit nepřítomnost fytoplazmy

v daném typu rozmnožovacího materiálu (očka, rouby) rostliny, která byla v minulosti infikována.

A právě pro diagnostiku fytoplazmy ovocných dřevin je důležitá znalost průběhu infekce a její rozmnožovací a rozšiřovací schopnosti v testované rostlině. Fytoplazmová infekce bývá v počátečním stádiu latentní. Délka trvání latence je ovlivněna výše uvedenou škálou faktorů. V závislosti na citlivosti genotypu infikované rostliny se fytoplasma ve floémové tkáni namnoží a dojde ke zvýšení její koncentrace, což se může projevit šokovou fází a dochází tak ke vzniku a projevu typických příznaků.

Systematické infekce se u bylin vyvíjejí rychle, ale u ovocných stromů může šíření fytoplazmy v rostlině trvat i několik let. Skutečnost, že fytoplasma není v rostlině zcela difúzně rozšířena, komplikuje výběr diagnostické metody a vlastní výběr reprezentativního vzorku pro testování ovocných kultur nejen biologickými ale i laboratorními metodami (PCR). Laboratorní metody slouží především pro rychlé vyloučení nemocných rostlin nebo jako rychlý orientační test výchozích matečných materiálů v matečnicích a množárnách rouků. Specifické testy na dřevinných indikátorech nelze ničím dosud nahradit, a to díky jejich vypovídající schopnosti. Proto jsou doporučovány i pracovní skupinou EPPO jako důležitý krok k získání zdravého množitelského materiálu (SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

3.6.5 Výhody a praktické uplatnění biologického testování

Testování na dřevinných indikátorech je sice časově náročnější než metody laboratorní, nicméně umožňuje detekovat přítomnost patogena, který může být z nějakého důvodu laboratorní metodou nedetekovatelný. To znamená, že může nastat případ tzv. falešné negativy anebo naopak falešné pozitivy laboratorního testu, která může být způsobena vnějšími vlivy prostředí rostliny nebo lidským faktorem během odběru vzorku či práce v laboratoři.

Vzhledem k tomu, že ani výsledky biologického indexingu nemají vždy stoprocentně vykazující schopnost, je vhodné během certifikace rozmnožovacího materiálu prověřit zdravotní stav rostlin určených pro získání *Superelitního materiálu* (nejvyšší stupeň certifikace rozmnožovacího materiálu, ze kterého je odvozován další množitelský materiál v dalších stupních a následně sadbový materiál kombinací biologického indexingu i laboratorních metod). Až poté lze rostlinu klasifikovat jako prostou fytoplazem. Ještě v nedávné minulosti, kdy neexistovala možnost použití molekulárních metod PCR, byly biologické testy jediným způsobem, jak přítomnost fytoplazmy

v rostlině detekovat.

Pro účely biologického indexingu jsou využívány citlivé genotypy rostlin (odrůdy či druhy), které umožňují patogenu se namnožit do vysokých koncentrací, které pak vyvolají projev typických příznaků (SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

Z praktického důvodu proveditelnosti je v současné době nejvíce využívána a metodikami EPPO doporučována metoda tzv. dvojitého očkování. Při použití této metody však hrozí riziko nepřítomnosti fytoplazmy v letních očkách díky vysokým teplotám (EPPO, 2001).

3.6.6 Použití biologického testování pro detekci fytoplazmy

Podrobná studie, zabývající se touto problematikou, byla ve VŠÚO prováděna například během let 1961–1965.

U 27 stromů byl proveden test přítomnosti proliferace několika způsoby: jednoduchým roubováním semenné podnože (JR), dvojitým roubováním podnože (DR), jednoduchým očkováním (JO), dvojitým očkováním (DO), terčíkem kůry na semenáči (T1), terčíkem kůry na starší strom (T2), roubem testovaného stromu na zdravém starším stromu, očkem testovaného stromu na zdravém starším stromu (O), přeroubováním testovaného stromu indikátorovým roubem (RI) a kořenovou metodou (KT).

Nejvyšší detekční schopnost prokázal kořenový test, kdy byla přítomnost fytoplazmy detekována pozitivní reakcí u všech testovaných infikovaných rostlin. U testovaných stromů, které jevíly typické příznaky, byl zaznamenán pozitivní přenos fytoplazmy (kromě jediného případu) při přeroubování stromů indikátorovým roubem (metoda RI). Rouby indikátoru naroubované na stromy s přechodnou ztrátou typických příznaků neukázaly během prováděné studie žádné zřetelné příznaky proliferace.

Pokud bylo dosaženo pozitivních výsledků přenosu choroby při ostatních testovacích metodách, došlo k tomu v naprosté většině jen tehdy, když inokulum pocházelo z metly. Na základě tohoto rozsáhlého srovnávacího studia přenosu choroby bylo tehdy konstatováno, že je fytoplazma proliferace lokalizována především v kořenové soustavě nemocného stromu a že kořenový test je dosud nejspolehlivější metodou jeho indikace (SEIDL, 1966).

3.6.7 Uplatnění biologického testování v diplomové práci

V rámci této práce byly zvoleny 3 různé způsoby - metodiky založení testovacích rostlin, u nichž budou porovnány výsledky. Do studie nebylo zařazeno roubování kořenů, které je uváděno běžně jako nejspolehlivější biologický test. Jednou z jeho nevýhod

provádění v praxi je nutnost použití semenných rostlin 'Golden Delicious' a problematické získávání průměrných vzorků kořenů testované rostliny. Metoda roubování kořenů vyžaduje metodickou specifickou zručnost v porovnání s běžným roubováním a očkováním. Díky této studii bude možné porovnat, zda se fytoplazma vyskytovala v roce odběru v letním (očko spící) nebo v zimním rozmnožovacím materiálu (roub) (SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

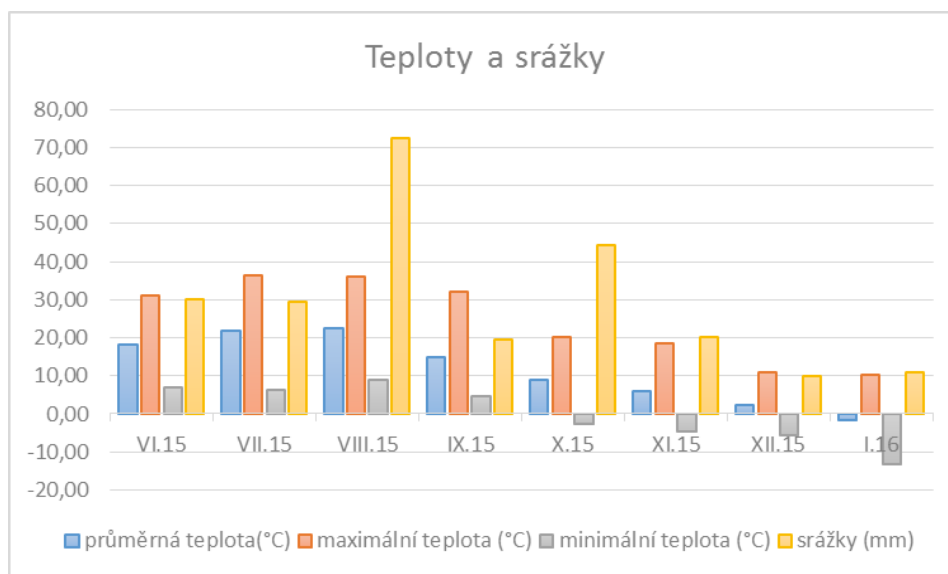
4. Materiál a metodika

4.1. Pokusná plocha

Experiment (Přílohy, Obr. 11; Přílohy, Obr. 12) byl založen na pokusné a demonstrační ploše Ústavu šlechtění a množení zahradnických rostlin v areálu Mendelovy univerzity v Brně, která se nachází v nadmořské výšce 220-250 m n. m., přitom zeměpisné souřadnice jsou 49°12'38" N, 16°36'56" E.

Testovaný rostlinný materiál byl vysázen do kontejnerů o objemu 2,5 litru a byl v období od června 2015 do konce ledna 2016 umístěn v pokusné izolační kleci na agrotextilii. V prostoru klece byl vytvořen izolát, který sloužil k zamezení výskytu vektorů. Plocha klece byla cca 3 x 10 metrů orientovaná na jihozápad. Během vegetace byla třikrát denně (v 5.00, 7.00 a 18.00 hodin) zajištěna závlaha v intervalu deseti minut.

Maximální denní teploty, minimální denní teploty a úhrn srážek za jednotlivé měsíce od založení pokusu do jeho přemístění do skleníku jsou patrné z grafu 1. Na podzim roku 2015 byly kontejnery zazimovány (jako ochrana byl použit biologický materiál listů). Testovaný rostlinný materiál byl přesunut 9. února 2016 do skleníku k urychlení z důvodu omezeného časového prostoru pro tento experiment.



Graf 1 Úhrn teplot a srážek za období od 1. 6. 2015 do 31. 1. 2016.

Zdroj: BROTAN, 2016

4.2 Použitý rostlinný materiál

Testovný rostlinný materiál použitých odrůd 'Boskoopské', 'Ribstonské', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneho' a 'Panenské české' byl odebrán v produkčním sadě, který se nachází v kraji Vysočina v katastrálním území obce Sulíkov. Obec se nachází

v nadmořské výšce 526 m n. m.. Mateřský strom odrůdy 'Ribstonské' (na mapě zaznačené číslem 1) je vysazen na zeměpisné souřadnici 49°32'43.730"N, 16°30'5.935"E, odrůdy 'Panenské české' (na mapě zaznačené číslem 2) na zeměpisné souřadnici 49°32'43.643"N, 16°49'12.72"E, odrůdy 'Boskoopské' (na mapě zaznačené číslem 3) na zeměpisné souřadnici 49°32'46.073"N, 16°30'1.455"E, odrůdy 'Gascoigneho' (na mapě zaznačené číslem 4) na zeměpisné souřadnici 49°32'43.837"N, 16°30'3.772"E a odrůdy 'Kanadská reneta' (na mapě zaznačené číslem 5) na zeměpisné souřadnici 49°32'45.077"N, 16°29'57.901"E (Obr. 1).



Obr. 1 Geografická poloha testovaných odrůd 'Boskoopské', 'Ribstonské', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneho' a 'Panenské české'.

Zdroj: archiv autora, 2016

4.2.1 Indikátorová odrůda 'Golden Delicious'

Synonyma a cizí názvy: Stark's Golden Delicious, Yellow Delicious, Delicious zlatý, Delicious žlutý, Galber Köstlicher, Zlotoje prevozchodnoje.

'Golden Delicious' je původem z USA. Byl nalezen v sadě Andersona Mullinse v okrese Clay, ve státě West Virginia v roce 1890 jako nahodilý semenáč. V roce 1914 zaslal Anderson Mullinse plody firmě Stark Bros z Louisiany, která tuto odrůdu od roku 1916 začala rozmnožovat. Z USA se 'Golden Delicious' rozšířil do všech ovocnářských sadů. V Evropě se začal pěstovat v 70. letech 20. století zejména v Holansku, Itálii, Francii, Jugoslávii, Maďarsku, Rumunsku a obou německých republikách (NDR, SRN).

Dále byl silně rozšířen a pěstován na Novém Zélandu, v Austrálii, Libanonu a Jihoafrické republice, kde zaujímal 40 % z celkové produkce jablek. U nás byl pěstován zejména v produkčních oblastech v teplejších klimatických ovocnářských oblastech. Velké výsadby byly na Moravě, Litoměřicku, Kutnohorsku, ale i v Podkrkonoší (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Růst je středně bujný, strom vytváří vysoce kulovitou korunu, později mírně rozložitou, zahuštěnou středně dlouhým plodonosným obrostem. Odolnost proti napadení strupovitostí je nízká a proti napadení padlím jabloňovým je střední. Odrůda je náročná na polohu, půdy vyžaduje úrodné, polopropustné, s dostatkem vláhy. Vysazujeme ji především do teplých a středních poloh. Je náročná na chemickou ochranu (RICHTER, 2004).

Při pokusu byla použita očka Vf 'Golden Delicious' od firmy SEMPRA PRAHA a. s., která patří mezi největší šlechtitelské a semenářské firmy v České republice.

4.2.2 Testovaná odrůda 'Boskoopské'

Synonyma a cizí názvy: Schöner von Boskoop, Belle de Boskoop, Schöner van Boskoop, Boskopskaja krasavica, ReINETTE de Boskoop, Schoene van Boskoop. Červená mutace – Boskoopské červené, Roter Boskoop, Bletroter Boskoop, Rode Boskoop (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969; KOHOUT, 1960).

Pochází ze škoлек K. J. W. Ottolanderu v Boskoopu u Goudy v Holandsku, kde bylo objeveno v polovině 19. století (1878) jako postranní výhon pláňete. Dnes se pěstuje hlavně barevná mutace 'Boskoopského' – 'Boskoopské červené'. Pěstitelské, morfologické a fenologické znaky, vyjma barvy plodů, jsou téměř shodné. Boskoopské červené pochází z Německa, kde byla v roce 1923 objevena na stromě Boskoopského Schmitz-Hübschem v sadě O. Baumanna ve Wardmannshofu u Rees mutace s červenými plody. V roce 1939 ji pod novým jménem jako novou odrůdu začal množit Schmidt-Hübsch.

V zahraničí byla tato odrůda rozšířena téměř ve všech státech, ve kterých se ve značné míře pěstovaly jabloně. Hodně se pěstovala ve Švýcarsku, Dánsku, Holandsku, Německu a dalších státech. U nás byla hojně rozšiřována v letech 1950 – 1969, až do zavedení vhodnějších zimních odrůd (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Strom je velmi bujně rostoucí, tvoří kulovitou korunu, řidší, široce rozložitou. Letorosty jsou dlouhé a silné, červenohnědé, bohatě žlutě tečkované. List je velký, široce

vejčitý, tmavý, slabě dvojmo vroubkovaný. Květ je velký, narůžovělý, raně kvetoucí. Plodnost je pozdní ale pravidelná. Požaduje živné, hluboké, dostatečně vlhké půdy. Optimální jsou i vyšší, chráněné a slunné polohy. Nesnáší sucho. Plod je velký, válcovitě kulatý s tuhou slupkou zelenožluté barvy s červenooranžově pruhovaným líčkem (KOHOUT, 1960).

U použitého rostlinného materiálu testované odrůdy 'Boskoopské' byla přítomnost fytoplazmy potvrzena v roce 2010 v Diagnostické laboratoři odboru diagnostiky Státní rostlinolékařské správy metodou PCR a RFLP.

4.2.3 Testovaná odrůda 'Ribstonské'

Synonyma a cizí názvy: Ribstoner Pepping, Ribstonský jadernáč, Ribston Pippin, Glory of York, ReINETTE de traver, Pepin Ribstona, Pepina Ribstona.

Tato odrůda vznikla jako semenáč ze semen dovezených z Rouenu (Francie) v roce 1686 nebo 1688 v zahradě zámku Ribston u Knaresboroughu v hrabství York v Anglii. 'Ribstonské' bylo rozšířeno ve všech evropských státech i v Americe. V současné době není již zastoupeno v tržním sortimentu (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Strom zpočátku roste bujně a tvoří velké, široké koruny, později s převislými větvemi. Letorosty jsou střední, hnědočervené, plstnaté, silně tečkované. List je střední, našedlé barvy, ostře zubatý, vejčitého tvaru. 'Ribstonské' je velmi náročné na půdy, vyžaduje je živné a vlhčí, vyhovují mu mírné polohy. Prospívá mu vlhkost vzduchu, proto se nejlépe hodí do podhůří. Plod je středně velký, kulovitý, zlatožlutě zbarvený z $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ červeně pruhovaný (KOHOUT, 1960).

4.2.4 Testovaná odrůda 'Gascoigneho šarlatové'

Synonyma a cizí názvy: Gascoynes Scharlachroter, Gascoyne's Scarlet Seedling, Glory of England (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969; KOHOUT, 1960).

Tuto odrůdu vyšlechtil Mr. Gascoyne v Sittingbourne v Anglii. Do praxe byla zavedena v roce 1871. V zahraničí byla hojně rozšířena v západní Evropě, zejména v Německu. U nás se vyskytovala zvláště v severních Čechách v dřívějších vysokokmenných výsadbách (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Zpočátku tvoří bujně, později středně rostoucí široce rozložitou korunu, náročnou na řez. Letorosty jsou středně silné, hnědočervené, nápadně tečkované. List je velký, elipčitý, nepravidelně tupě pilovitý, na rubu plstnatý. Odrůda má střední velikost květu narůžovělé barvy. Požaduje dostatečně vlhké, dobře obdělávané půdy, teplé, slunné a chráněné polohy. Po celém plodu se vyskytují bělavé až tmavší tečky (KOHOUT, 1960).

4.2.5 Testovaná odrůda 'Kanadská reneta'

Synonyma a cizí názvy: Karmínová reneta, Kanada Renette, Reinette du Canada, Reneta Kanadyjska, Pariser Rambour, Renet Kanadskij. Původ této odrůdy není přesně známý, je to buď Franciie nebo Severní Amerika. Stará odrůda byla uváděná v cenících již v roce 1771. Kanadská reneta je v mládí velmi bujně rostoucí, s větvemi hluboko skloněnými. Dobře obrůstá krátkým až středně-dlouhým plodonosným dřevem. Ve kmenech je málo odolná proti mrazům, a proto je nutné použít mezištěpování. (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Letorosty jsou silné, plstnaté, hustě tečkované. Květ je středně velký, bílý, slabě narůžovělý. Na půdu i polohu je odrůda velmi náročná. Žádá je hluboké, úrodné, přiměřeně vlhké, polohy teplé a chráněné. Plod je ploše kulovitý nebo vysoký, zelenožlutě zbarvený s tlumeně začervenalým líčkem a s charakteristickými rzivými tečkami hvězdičkovitého tvaru (KOHOUT, 1960).

Odolnost ke strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis*) je střední, padlím jabloňovým (*Podospaera leucotricha*) trpí méně. Na vlhkých stanovištích trpí rakovinou. Proti mrazům je odolnost nízká (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

4.2.6 Testovaná odrůda 'Panenské české'

Synonyma a cizí názvy: Roter Jungfernapfel, Böhmischer Jungfernapfel, Pomme des Vierges, Panienskie czerwone, Kardinálka, Plizírkové, Křehouče (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

V 30. letech 19. století se ve všech krajích České republiky pěstovala odrůda zvaná kardinálka. V každé větší zahradě byl nějaký strom této odrůdy, což bylo důkazem toho, že se jablko těšilo veliké oblibě u všech pěstitelů ovocných stromů. Říkalo se mu též kardinálice (SUCHÝ, 1931).

'Panenské české' je odrůdou domácího původu, velmi starou, pěstovanou od nepaměti. V zahraničí bylo pěstováno v okolních státech, zejména v Německu a Polsku. U nás bylo rozšířeno do 70. let 19. století, pak ze sortimentu ustoupilo se zaváděním nízkokmenných výsadeb (DVOŘÁK *et* VONDRÁČEK, 1969).

Strom tvoří korunu středně vzrůstnou s převislými větvemi především ve stáří. Letorosty jsou slabé, červenavě hnědé, plstnaté a tečkované. List je malý, na rubu šedě plstnatý a s okraji slabě zubatými. Květ je velký, růžové barvy. Požaduje těžší, vlhčí, živné hlubší půdy s velkým obsahem vápna. Plod je střední až drobný, tupě kuželovitý, žluté barvy, která je téměř kryta sytě karmínovou ojíněnou červení. Žlutá část plodu

je drobně tečkovaná (KOHOUT, 1960). Neocenitelnou předností tohoto jablka je, že otlučené nezahnívá, neboť má pevnou dužninu a každé poškozené místo zhoubovatí. Polohy vyžaduje vyšší s vlhčím ovzduším (SUCHÝ, 1931).

Stějně jako u odrůdy 'Boskoopské' byla u použitého rostlinného materiálu testované odrůdy 'Panenské české' přítomnost fytoplazmy potvrzena v roce 2010 v Diagnostické laboratoři odboru diagnostiky Státní rostlinolékařské správy metodou PCR a RFLP.

4.2.7 Podnožová odrůda 'Jadernička Moravská'

Synonyma a cizí názvy: Vinary, Jablko vinné, Chroupě kravařské, Jadernice, Pepin de Moravie.

'Jadernička Moravská' je stará moravská podzimní až zimní odrůda. Vznikla jako semenáč neznámého původu. Odedávna byla pěstovaná hlavně na severní Moravě, a to zejména na Valašsku, kde je známá již od 18. století (KOHOUT, 1960). Plody jsou středně velké, kuželovitého nebo i oválně kulatého tvaru. Barva je žlutá s načervenalým líčkem na sluneční straně. Hodí se pro přímý konzum, výrobu moštů, vín, pálenky, povidel, sušení, výrobu přesnídávek, pyré i pro skladování.

Tato odrůda je velmi nenáročná, dává přednost těžším, vlhčím půdám s vyšším podílem vápna. Je vhodná téměř do všech oblastí, daří se jí i ve vyšších polohách, nejlépe otevřených. Je velmi odolná vůči mrazům. Stromy jsou bujně rostoucí, mají mohutnou, rozložitou až mírně převislou korunu. Pěstují se jako vysokokmeny (PEŠEK, 2016).

Použitá podnož 'Jadernička Moravská' je původem z Ovocné školky v Bojkovicích - Radim Pešek.

4.3 Metodika

4.3.1 Založení experimentu

Experimentální testované rostliny byly založeny dne 30. 6. 2015 a pěstovány v kontejnerech o objemu 2,5 litru na pokusné a demonstrační ploše Ústavu šlechtění a množení zahradnických rostlin v areálu Mendelovy univerzity v Brně. Toto datum bylo stanoveno s ohledem na eliminaci eventuálního přenosu patogenu na experimentální testovaný rostlinný materiál hmyzími přenašeči (*Cacopsylla picta*, *Cacopsylla melanoneura*).

Experiment byl založen s využitím tří metod aplikace dřevinného indikátoru pro každou testovanou odrůdu (Tab. 1). Experimentální testovaný rostlinný materiál byl před začátkem vegetačního období roku 2016 (9. února) přenesen do skleníku z důvodu přirychlení a následného odebrání biologického materiálu pro detekci fytoplazmy.

Tab. 1 Jednotlivé varianty použitých metod a experimentálních testovaných rostlin.

Odrůda	<u>metoda 1</u>	<u>metoda 2</u>	<u>metoda 3</u>
	Podvojně roubovánív zimě testované odrůdy a indikátoru na semenáč	Letní očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v zimě v ruce na semenáč	Dvojitě letní očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč
'Panenské české' (PČ)	10 rostlin	10 rostlin	10 rostlin
'Kanadská reneta' (KR)	10 rostlin	10 rostlin	10 rostlin
'Gascoigneho šarlatové' (G)	10 rostlin	10 rostlin	10 rostlin
'Ribstonské' (R)	10 rostlin	10 rostlin	10 rostlin
'Boskoopské' (B)	10 rostlin	10 rostlin	10 rostlin

Zdroj: archiv autora, 2016

4.3.2. Použité postupy očkování

Očka byla odebrána v poslední dekádě srpna roku 2015, teplota vzduchu se pohybovala kolem 20 °C. Neprodleně po odebrání byla očka uskladněna do chladícího boxu, a ještě tentýž den byla inokulována na testovaný rostlinný materiál.

V praktické části diplomové práce bylo použito **klasické očkování T-řezem** (Přílohy, Obr. 13) a **Forkertovo očkování** (Přílohy, Obr. 14). Klasické očkování (T-řez) je nejčastějším způsobem očkování. Kůru podnože i s lýkem se nařízne do tvaru písmene T a do vytvořeného řezu se vloží očko se štítkem. Při Forkertově očkování uděláme na podnoži zářez až do dřeva a do zářezu vložíme očko.

Klasické očkování T-řezem vyžaduje dostatek mízy a provádí se v hlavní očkovací sezóně (červenec až srpen), Forkertovo očkování se uplatňuje v době, kdy podnož může mízu ztrácet (konec srpna) (URBAN, 1986; BLAŽEK 1998).

K odběru oček byla použita střední vyzrálá část letorostu, která byla odlistěna tím způsobem, že byly ponechány 1 cm dlouhé řapíky, jenž slouží ke kontrole ujmoutí očka. Tato kontrola byla provedena po čtrnácti dnech od inokulace. U správně srostlých oček po dotknutí odpadává zbytek řapíku (URBAN, 1986).

4.3.3. Použité postupy roubování

Rouby byly odebrány z matečné rostliny v druhé dekádě ledna roku 2015 při teplotě

4°C. Ihned po odběru byly uloženy do chladných prostor (lednice).

V praktické části diplomové práce bylo při roubování pokusných jabloní použito **roubování anglickou kopulací** (Přílohy, Obr. 15), které představuje zlepšený způsob roubování kopulací. Roub i podnož seřízneme šikmo tak, aby plocha obou řezů byla stejně dlouhá. Pak na obou řezech zařízneme jazýček tak, aby se oba jazýčky vsunuly do sebe. Je-li práce pečlivě provedena, je srůst dokonalý, protože styčná plocha roubu s podnoží je mnohem větší než při obvyklé kopulaci (URBAN, 1986).

4.3.4. Použité metody testování

Metoda podvojného roubování v zimě testované odrůdy a indikátoru na semenáč (metoda číslo 1, Obr. 2).

Na bezvirózní semennou certifikovanou podnož byl dne 30. 6. 2015 naroubován roub testované odrůdy a následně byl na tento roub naroubován indikátor Vf 'Golden Delicious'. Rouby indikátoru a testované odrůdy byly odebrány v zimě. Během rašení roubu indikátoru byla sledována případná přítomnost typických příznaků (změněné zúžené prodloužené chlorotizované palisty apod.). Metoda podvojného roubování byla využita u všech testovaných odrůd v počtu 50 ks (každá odrůda á 10 ks rostlin).



Obr. 2 Podvojné roubování testované odrůdy 'Ribstonské' a indikátoru Vf 'Golden Delicious' na semenáč.

Zdroj: archiv autora, 2015

Nevýhodou této metody pro praxi je potřeba zručnosti v porovnání s běžně používaným dvojitým očkováním. Další nevýhodou je to, že se během zimy může fytoplazma za nízkých teplot stáhnout do kořenů, proto nemusí být v zimních roubech testovaných stromů obsažena, což může zkreslit výsledek.

Výhodou této metody je možnost časového náskoku proti metodám používajícím očkování. Další výhodou je vizuální projev přítomnosti patogenu na indikátoru již v prvním roce.

Metoda letního očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v zimě v ruce na semenáč (metoda číslo 2, Obr. 3)

Dalším z možných způsobů inokulace patogenu na testované rostliny by mohla být inokulace uskutečněná v létě, a to na podnože naroubovaných rostlin nebo přímo na roub indikátoru, letním očkem testovaných rostlin (2-3 očka) (EMBER *et al.*, 2004).

Metoda letního očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v zimě v ruce na semenáč byla provedena tak, že na prostokořennou bezvirózní semennou certifikovanou podnož byl dne 30. 6. 2015 v ruce naroubován zimní roub indikátoru. Naroubovaná podnož byla vysazena do kontejneru (2,5 litru) a na ni bylo následně dne 15. 9. 2015 Forkertovým očkováním přeneseno letní očko testované rostliny (potenciální zdroj infekce). Očko bylo umístěno pod roub indikátoru. Metoda letního očkování byla využita u všech testovaných odrůd v počtu 50 ks (každá odrůda á 10 ks rostlin).



Obr. 3 Letní očkování testované odrůdy 'Ribstonské' na indikátor Vf 'Golden Delicious' roubovaný v zimě na semenáč.

Zdroj: archiv autora, 2015

Metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč (metoda číslo 3, Obr. 4, Obr. 5)

Na bezvirózní semennou certifikovanou podnož, která byla zasazena dne 30. 6. 2015 do kontejneru (2,5 litru), byl 1. 9. 2015 ve výšce 12–15 cm nad zemí naočkován klasickým očkováním (T-řezem) indikátor. Po 14 dnech (15. 9. 2015) bylo pod indikátor ve výšce 5–8 cm nad zemí naočkováno Forkertovým očkováním očko testované rostliny. Forkertovo očkování bylo zvoleno z důvodu docílení vyššího ujetí oček, protože v období realizace inokulace již kleslo proudění mízy v testovaných rostlinách. Metoda dvojitého letního očkování byla využita u všech testovaných odrůd v počtu 50 ks (každá odrůda á 10 ks rostlin).

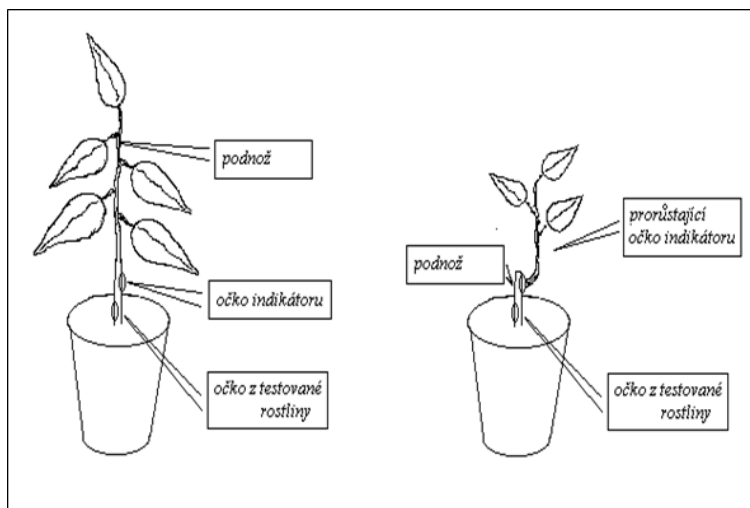


Obr. 4 Dvojité letní očkování indikátoru Vf 'Golden Delicious' a testované odrůdy 'Ribstonské' na semenáč.

Zdroj: archiv autora, 2015

Je to nejjednodušší metoda, nejvíce využívána v praxi (doporučována v metodikách EPPO). Nevýhodou této metody je, že letní očko infikované rostliny může být díky vysokým letním teplotám prosté fytoplazmy. Nevýhodou oproti metodám využívajícím roubování je časová náročnost, protože množství fytoplazmy v očku, pokud se v testované rostlině nachází, může být v porovnání s množstvím fytoplazmy v roubu menší.

Zkušenosti získané z praxe potvrzují fakt, že míra koncentrace fytoplazmy při odběru letních oček či zimních roubů čast závisí na vnějších teplotách (extrémně nízké či vysoké přítomnost fytoplazmy potlačují). Namnožení fytoplazmy dosahující koncentraci, která vyvolává příznaky, vyžaduje delší časový úsek. Pokud je indikátorová rostlina založena pomocí očkování, potřebuje očko indikátoru v porovnání s roubovanci pro rozvinutí případných příznaků minimálně jedno růstové vegetační období navíc (WOOD, 1989; SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).



Obr. 5 Metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč.
Zdroj: SUCHÁ, 2016

4.3.5 Metodický postup pro ošetřování testovaných rostlin během vegetace

U každé použité testovací metody byla založena kontrola: samotný indikátor naroubovaný nebo naočkovaný na podnož. Porovnáním těchto rostlin s testovanými rostlinami byla lépe hodnocena přítomnost příznaků daného onemocnění.

V případě **metody číslo 1 a 2** (Přílohy, Obr. 16) byl seříznut indikátor na 2-3 očka, u **metody číslo 3** (Přílohy, Obr. 17) byla semenná podnož seříznuta na ostro cca 3-5 mm mírně šikmo nad vrchním očkem a následně byla vyčištěna podnož od podrůstajících výhonů.

Rostliny udržujeme a regulujeme pomocí letního řezu tak, abychom co nejvíce podpořili bujný růst indikátoru. Vylamujeme očka rašící na podnoži. Výhony z oček (**metoda číslo 2 a 3**) a rouby (**metoda číslo 3**) testovaných rostlin necháváme růst (podporují proudění mízy, kde se může nacházet fytoplasma), ale zakracujeme je pomocí letního řezu asi na třetinu.

Sledujeme a hodnotíme případný výskyt příznaků již od začátku rašení v pravidelných intervalech. Pro porovnání testovaných rostlin využíváme *negativní kontroly*.

Období pro vyhodnocení zdravotního stavu testované rostliny (testy prováděné na poli) nesmí být podle metodik EPPO kratší než dva roky. Vzhledem k omezené délce období provádění studie pro diplomovou práci, která zřejmě neumožní u všech metod plné rozvinutí příznaků, byly rostliny indikátorů otestovány pomocí molekulárních metod PCR (real-time PCR), které umožní zjistit koncentraci fytoplazmy v indikátoru na začátku vegetace.

Testované rostliny je vhodné mít pod chemickou insekticidní clonou a je nutné je pěstovat tak, aby k nim neměl přístup žádný hmyzí vektor (zasíťovaná větrací okna, případně zavěšení žlutých lepočných desek, které mohou přiletět a monitorovat) (SUCHÁ, osobní sdělení, 2016).

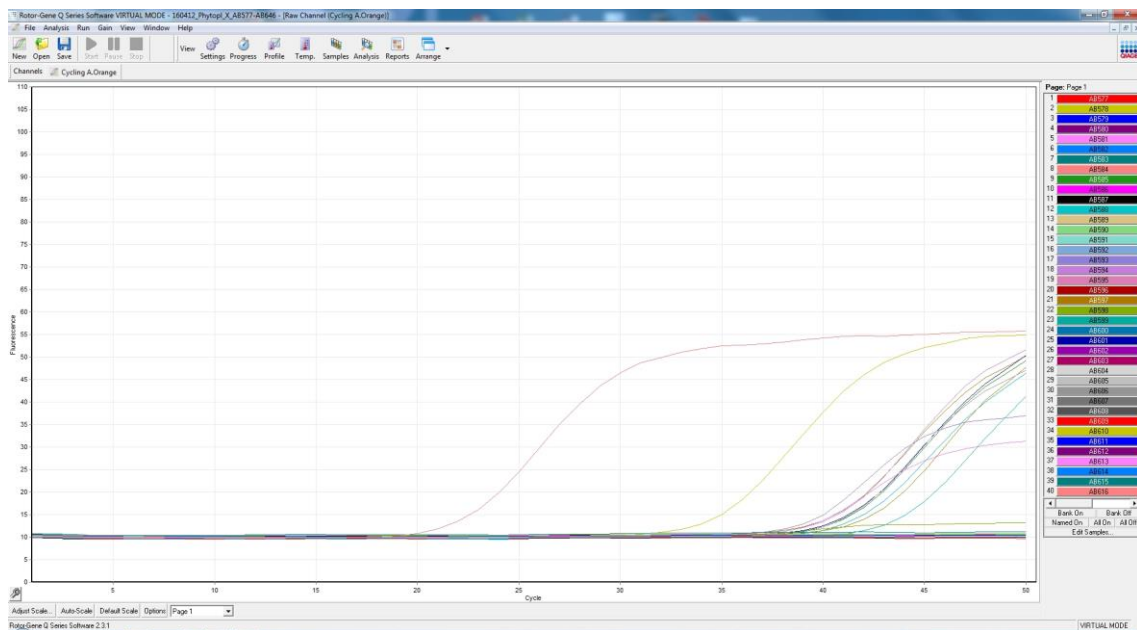
4.4 Ověření přítomnosti fytoplazmy v testovaných rostlinách pomocí molekulární metody real-time PCR

V červnu 2015 byly otestovány matečné rostliny jabloní odrůd, které byly vybrány pro experiment. 8. 2. 2016 byly odebrány vzorky z testovaných rostlin založených **metodou číslo 1**, a to tak, že byl odebrán 1 vzorek z od každé odrůdy. 30. 3. 2016 byl proveden odběr vzorků z výhonů indikátoru Vf 'Golden Delicious', z každé varianty každé odrůdy experimentu 4 vzorky.

Vzorky byly testovány na přítomnost fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí metody real-time PCR. Jedná se o variantu metody PCR, která umožňuje zjistit výchozí množství amplifikovaného fragmentu (templátu) ve vzorku relativně - na základě poměrů koncentrací mezi různými vzorky, tj. 1x, 3x, 7.5x, anebo absolutně - je stanovena přesná hodnota koncentrace templátu na základě znalosti koncentrace standardu.

V průběhu reakce je sledován v reálném čase nárůst koncentrace produktu v čase pomocí fluorescenčních látek/prób, které interagují se vznikajícími fragmenty. Reakce probíhá ve speciálním přístroji (real-time cycler). Výsledkem sledování je graf změn fluorescence v závislosti na počtu amplifikačních cyklů, z nějž lze hledané hodnoty koncentrací vypočítat (vypočtení provádí připojený počítač).

S realizací reakce real-time PCR souvisí termín **práh (threshold)**, což je hodnota fluorescence pozadí, kterou automaticky stanovuje přístroj. Pokud fluorescence reakce přesáhne tuto hodnotu, dochází k amplifikaci produktu v reakci. Práh (threshold) je v grafu vždy uváděn na ose „y“. Termín (zkratka) **Ct** znamená **cyklus amplifikace**, ve kterém hodnota fluorescence reakce překoná prahovou fluorescenci (threshold). Je nepřímo úměrná koncentraci templátu v reakci, proto platí následující pravidlo: čím menší Ct, tím vyšší počáteční množství amplifikované DNA. Cyklus amplifikace Ct je vždy v grafu uváděn na ose „x“ (Obr. 6) (LENZ, 2016).



**Obr. 6 Graf změn fluorescence v závislosti na počtu amplifikačních cyklů, z něž lze hledané hodnoty koncentrací fytoplazmy ve vzorcích vypočítat (pomocí připojeného počítače).
Zdroj: SUCHÁ, 2016**

Celková DNA byla izolována z lýka dvouletých výhonů standartní metodou využívající CTAB. Ve vzorcích byla provedena kvantifikace fytoplazmy pomocí real-time PCR systému s využitím Rotor – Gene Q (Přílohy, Obr. 18), s využitím Combi Taq DNA polymerázy (Top-Bio) s dosud nepublikovanými primery. Jako interní standard, ke kterému byla spočítána relativní kvantita, byl použit chloroplastový gen 16S rDNA.

5. Výsledky

Účelem experimentu realizovaného v rámci diplomové práce bylo nalézt nejjednodušší a zároveň nejspolehlivější způsob přenosu infekce fytoplazmou (z infikovaného rostlinného materiálu na zdravý testovaný materiál) při použití 3 různých způsobů testace rostlin. Počet úspěšných infekcí se odvíjí od použité techniky inokulace, ale zároveň se může výrazně lišit v rámci stejné odrůdy.

Cílem experimentu byla optimalizace postupu detekování fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí dřevinných indikátorů pro rutinní použití, jako alternativy k molekulárním metodám, založeným na principu real-time PCR.

5.1 Označení rostlin

Testované odrůdy jablek mají v některých případech názvy složené ze dvou slov, a proto byly pro přehlednost uvádění výsledků označeny zkratkami, které jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2 Zkratky používané pro označení celých názvů odrůd v průběhu hodnocení výsledků.

Celý název odrůdy	Zkratka
‘Panenské české’	PČ
‘Kanadská reneta’	KR
‘Gascoigneho’	G
‘Ribstonské’	R
‘Boskoopské’	B

Zdroj: archiv autora, 2016

5.2 Úspěšnost inokulace

Ze 100 testovaných rostlin (50 testovaných rostlin u **metody číslo 2** a 50 testovaných rostlin u **metody číslo 3**), kde bylo provedeno očkování (u **metody číslo 2** bylo provedeno jednoduché očkování a u **metody číslo 3** bylo provedeno dvojité očkování), u 21 rostlin inokulované očko testované odrůdy nepřiřostlo (odpadlo), u 4 testovaných rostlin nevyrašilo očko indikátoru a u 70 testovaných rostlin nevyrašilo očko testované odrůdy. U odrůdy ‘Kanadská reneta’ byl zaznamenán nejvyšší počet rostoucích oček testované odrůdy (4 očka). Naopak u odrůd ‘Panenské české’ a ‘Ribstonské’ nevyrašilo očko testované odrůdy ani jedno.

V případě **metody číslo 1** a částečně **metody číslo 2**, kde bylo použito roubování (u **metody číslo 1** bylo provedeno dvojité roubování u 50 testovaných rostlin a u **metody číslo 2** bylo provedeno jednoduché roubování u 50 testovaných rostlin), byla 100% úspěšnost ujmoutí roubů u všech testovaných odrůd.

Přehledný rozpis úspěšnosti ujmoutí roubů a oček a seznam použitých zkratk ke každé testované odrůdě (**metoda číslo 1, 2 a 3**) je zapsán v Tab. 8 (Přílohy).

5.3 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 1

Na 34 testovaných rostlinách z celkového počtu 50 rostlin nebyly detekovány žádné typické příznaky proliferace (Přílohy, Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12, Tab. 13). Jako podezřelé na typické příznaky proliferace byly detekovány 3 testované rostliny odrůd 'Panenské české' (vzorek PČ 1, PČ 3) a 'Kanadská reneta' (vzorek KR 2). Na 28 testovaných rostlinách všech odrůd z celkového počtu 50 rostlin, byl prokázán výskyt mšice, z toho ve 13 případech extrémně, což mohlo způsobit jejich zakrslý růst. Zakrslý růst je jedním z příznaků proliferace, ale v tomto případě nelze jednoznačně určit, zda byl způsoben chorobou nebo napadením mšicemi. Rostlina odrůdy 'Panenské české' (vzorek PČ 2) měla barevné změny na listech (chlorotizace), rostliny odrůdy 'Ribstonské' (vzorky R 5 a R 8) uhynuly.

Na jednotlivých testovaných odrůdách nebyly typické příznaky onemocnění detekovány u 7 rostlin odrůdy 'Panenské české', u 9 rostlin odrůdy 'Kanadská reneta' a shodně u 6 rostlin odrůd 'Gascoigneo', 'Ribstonské' a 'Boskoopské'. Mšicemi byla nejvíce napadena odrůda 'Gascoigneo', nejméně 'Panenské české'. Uhynuly 2 rostliny odrůdy 'Ribstonské', barevné změny na listech (chlorotizace) vykazovala 1 rostlina odrůdy 'Panenské české'.

5.4 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 2

Výsledky experimentu jsou uvedeny v Přílohách, Tab. 14, Tab. 15, Tab. 16, Tab. 17, Tab. 18. Z celkového počtu 50 testovaných rostlin bylo 35 rostlin zcela bez typických příznaků, 20 rostlin bylo napadeno mšicemi. Podezření na přítomnost příznaků proliferace bylo u 8 rostlin, u 4 rostlin odrůd 'Panenské české' (vzorek R-PČ 8 a R-PČ 9), 'Kanadská reneta' (vzorek R-KR 9) a 'Ribstonské' (vzorek R-R 4) se objevil zhuštěný vrchol a zkrácená internodia. Uhynuly 2 rostliny u odrůd 'Gascoigneo' (vzorek R-G 6) a 'Ribstonské' (vzorek R-R 10). Zbývající testované rostliny měly zakrslý růst a všechny

byly poškozeny mšicemi.

V případě odrůdy 'Panenské české' byl zjištěn největší počet rostlin s vizuálními příznaky choroby (celkem 3 rostliny). U odrůdy 'Kanadská reneta' byly zaznamenány 2 podezřelé rostliny a u odrůd 'Gascoigneho', 'Ribstonské', 'Boskoopské' byla nalezena vždy pouze 1 podezřelá rostlina. Zakrslý růst vykazovalo 5 rostlin u odrůd 'Panenské české' (vzorek R-PČ 2), 'Kanadská reneta' (R-KR 5 a R-KR 6), 'Gascoigneho' (R-G 10) a 'Boskoopské' (R-B 7). Tyto rostliny byly zároveň napadeny mšicemi. Mšicemi bylo napadeno celkem 30 testovaných rostlin, z toho 2 rostliny u odrůdy 'Gascoigneho' (nejnižší počet napadených rostlin) a 8 rostlin u odrůdy 'Panenské české' (nejvyšší počet napadených rostlin).

5.5 Typické příznaky onemocnění na dřevinných indikátorech při použití metody číslo 3

U **metody číslo 3** bylo z celkového počtu 50 testovaných rostlin 20 rostlin bez vizuálních příznaků proliferace. Podezření na přítomnost příznaků proliferace bylo u 6 testovaných rostlin. Barevné změny na listech (chlorotizaci) měly 2 rostliny. Na celkem 21 rostlinách byl patrný zakrslý růst, zároveň všechny rostliny byly napadeny mšicemi. U 2 rostlin odrůd 'Kanadská reneta' (vzorek S-KR 10) a 'Boskoopské' (vzorek S-B 2) byl zřejmý zhuštěný vrcholový výhon. U odrůd 'Panenské české' (vzorek S-PČ 8), 'Ribstonské' (vzorek S-R 1) a 'Boskoopské' (vzorek S-B 1) nevyrašil výhon indikátorové rostliny.

U 7 testovaných rostlin odrůdy 'Gascoigneho' nebyly žádné vizuální příznaky proliferace, u odrůdy 'Ribstonské' jen u 2 rostlin. Ostatní rostliny této odrůdy byly zakrslého růstu nebo s podezřením na přítomnost příznaků proliferace. Výsledky experimentu jsou uvedeny v Přílohách, Tab. 19, Tab. 20, Tab. 21, Tab. 22, Tab. 23.

5.6 Výsledky testování přítomnosti fytoplazmy v pokusných rostlinách pomocí molekulárních metod

U odrůdy 'Panenské české', kde byla očka získána z matečné rostliny, u které byla laboratorně potvrzena přítomnost fytoplazmy, nebyla u testovaných **metod číslo 1 a 2** (byly odebrány 4 vzorky z každé metody, celkem 12 vzorků) metodou real-time PCR prokázána její přítomnost. U **metody číslo 3** byla prokázána v 1 případě, a to u odrůdy 'Panenské české' (vzorek S-PČ 4) (Přílohy, Obr. 19). Přítomnost fytoplazmového onemocnění u této testované rostliny dodatečně potvrzuje její zakrslý růst. Rostlina byla navíc poškozena mšicemi (Tab. 3).

Tab. 3 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy ‘Panenské české’.

Odrůda ‘Panenské české’	Výsledky metody PCR ¹⁾	Výsledky metody real-time PCR (hodnota Ct) ²⁾	Metody inokulace	Výsledky metody biologického indexingu - hodnocení příznaků u jednotlivých testovaných rostlin
matečná rostlina	+	-		
roubovanec únor	-	-		
vzorek PČ 2	-	-	<u>metoda 1</u>	zakrslá, poškozená mšicemi
vzorek PČ 3	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek PČ 5	-	-		podezřelá, zakrslý růst
vzorek PČ 9	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-PČ 1	-	-	<u>metoda 2</u>	bez příznaků
vzorek R-PČ 3	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-PČ 5	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-PČ 7	-	-		zakrslá, poškozená mšicemi
vzorek S-PČ 1	-	-	<u>metoda 3</u>	podezřelá, chlorotizace
vzorek S-PČ 4	+	34,96		zakrslá, poškozená mšicemi
vzorek S-PČ 6	-	-		bez příznaků
vzorek S-PČ 9	-	-		podezřelá, chlorotizace

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: 1) (+) míra koncentrace fytoplazmy v rostlině; (-) nepřítomnost fytoplazmy v rostlině
2) čím nižší je hodnota Ct (nižší číslo), tím větší je množství fytoplazmy v rostlině

Testované rostliny odrůdy ‘Boskoopské’ byly inokulovány očkovacím materiálem, který byl získán z matečné rostliny pozitivní na přítomnost proliferace. U odebraných vzorků (byly odebrány 4 vzorky z každé metody, celkem 12 vzorků) byla prokázána přítomnost fytoplazmy u **metody číslo 1** (vzorek B 10) a **metody číslo 2** (vzorek R-B 3). Tyto testované rostliny nevykazovaly typické příznaky tohoto onemocnění. U testované rostliny (vzorek R-B 3) (Přílohy, Obr. 20) je také zajímavý fakt, že došlo k přenosu fytoplazmy i přes neúspěšnost inokulace očka testované odrůdy (očko odpadlo).

U **metody číslo 3** nebyla prokázána přítomnost proliferace u žádného odebraného vzorku (Tab. 4). U testované rostliny (vzorek B 10), která byla inokulována **metodou číslo 1**, byla zjištěna vysoká koncentrace fytoplazmy v tkáni. Tato koncentrace byla nejvyšší ze všech testovaných rostlin (odrůd).

Tab. 4 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy ‘Boskoopské’.

Odrůda ‘Boskoopské’	Výsledky metody PCR ¹⁾	Výsledky metody real-time PCR (hodnota Ct) ²⁾	Metody inokulace	Výsledky metody biologického indexingu - hodnocení příznaků u jednotlivých testovaných rostlin
matečná rostlina	+	-		
roubovanec únor	+	34,14		
vzorek B 2	-	-	<u>metoda 1</u>	zakrslá, poškozená mšicemi
vzorek B 6	-	-		bez příznaků
vzorek B 9	-	-		bez příznaků
vzorek B 10	++	28,62		bez příznaků
vzorek R-B 1	-	-	<u>metoda 2</u>	bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-B 3	PP	35,69		bez příznaků
vzorek R-B 4	-	-		bez příznaků
vzorek R-B 5	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek S-B 3	-	-	<u>metoda 3</u>	bez příznaků
vzorek S-B 5	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek S-B 6	-	-		podezřelá, poškozená mšicemi
vzorek S-B 9	-	-		bez příznaků

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: 1) (+) míra koncentrace fytoplazmy v rostlině; (-) nepřítomnost fytoplazmy v rostlině 2) čím nižší je hodnota Ct (nižší číslo), tím větší je množství fytoplazmy v rostlině, PP potenciálně podezřelá

Pro inokulaci odrůdy ‘Ribstonské’ byly z mateřské rostliny použity očka a rouby pozitivní na přítomnost fytoplazmy. U **metody číslo 1** (byly odebrány 4 vzorky z každé metody, celkem 12 vzorků) byl výsledek laboratorně testovaných rostlin pozitivní ve 2 případech (vzorky R 4, R 10). Vzorek R 4 byl zakrslého vzrůstu (Přílohy, Obr. 21) byla zakrslého vzrůstu a poškozená mšicemi. Oproti tomu vzorek R 10 nevykazoval žádné typické příznaky onemocnění.

U **metody číslo 2** byly všechny testované rostliny bez typických příznaků onemocnění. Laboratorní testy neprokázaly přítomnost onemocnění u žádné z nich (vzorky R-R 2, R-R 3, R-R 7, R-R 9). Testované rostliny, které byly inokulovány pomocí **metody číslo 3** byly ve 3 případech negativní. Rostlina (vzorek S-R 10), která nevykazovala žádné typické příznaky onemocnění, byla pomocí metody real-time PCR detekována jako pozitivní (Tab. 5).

Tab. 5 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy ‘Ribstonské’.

Odrůda ‘Ribstonské’	Výsledky metody PCR ¹⁾	Výsledky metody real-time PCR (hodnota Ct) ²⁾	Metody inokulace	Výsledky metody biologického indexingu - hodnocení příznaků u jednotlivých testovaných rostlin
matečná rostlina	+	-		
roubovanec únor	-	-		
vzorek R 2	-	-	metoda 1	zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek R 4	+	33,92		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek R 9	-	-		bez příznaků
vzorek R 10	PP	36,19		bez příznaků
vzorek R-R 2	-	-	metoda 2	bez příznaků
vzorek R-R 3	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-R 7	-	-		bez příznaků
vzorek R-R 9	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek S-R 2	-	-	metoda 3	zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-R 3	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek S-R 7	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-R 10	+	34,92		bez příznaků

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: 1) (+) míra koncentrace fytoplazmy v rostlině; (-) nepřítomnost fytoplazmy v rostlině
2) čím nižší je hodnota Ct (nižší číslo), tím větší je množství fytoplazmy v rostlině, PP potenciálně podezřelá

Ze vzorků odrůdy ‘Kanadská reneta’ (byly odebrány 4 vzorky z každé metody, celkem 12 vzorků) u **metody číslo 1** ani 1 rostlina nevykazovala typické příznaky onemocnění. Žádná z nich nebyla pozitivní na základě metody real-time PCR. Přenos nebyl prokázán ani u **metody číslo 2**, kde 3 rostliny byly bez viditelných příznaků onemocnění a 1 rostlina byla poškozena mšicemi a zakrslého růstu.

U **metody číslo 3** byla 1 rostlina (vzorek S-KR 9) bezpříznaková, 1 rostlina (vzorek S-KR 3) (Přílohy, Obr. 22) byla podezřelá (zhuštěný vrchol) a 2 rostliny byly zakrslého růstu a poškozené mšicemi. Metoda real-time PCR neprokázala přítomnost patogenu u žádné z nich (Tab 6).

Tab. 6 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy ‘Kanadská reneta’.

Odrůda ‘Kanadská reneta’	Výsledky metody PCR ¹⁾	Výsledky metody real-time PCR (hodnota Ct) ²⁾	Metody inokulace	Výsledky metody biologického indexingu - hodnocení příznaků u jednotlivých testovaných rostlin
matečná rostlina	+	-		
roubovanec únor	+	33,3		
vzorek KR 1	-	-	metoda 1	bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek KR 5	-	-		bez příznaků
vzorek KR 7	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek KR 9	-	-		bez příznaků
vzorek R-KR 2	-	-	metoda 2	bez příznaků
vzorek -KR 3	-	-		bez příznaků
vzorek R-KR 6	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek R-KR 8	-	-		bez příznaků
vzorek S-KR 3	-	-	metoda 3	podezřelá, zhuštěný vrchol
vzorek S-KR 5	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-KR 8	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-KR 9	-	-		bez příznaků

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: 1) (+) míra koncentrace fytoplazmy v rostlině; (-) nepřítomnost fytoplazmy v rostlině 2) čím nižší je hodnota Ct (nižší číslo), tím větší je množství fytoplazmy v rostlině

Stejně jako u předcházejících odrůd byla matečná rostlina odrůdy ‘Gascoigne’ testována na proliferaci, a to s pozitivním výsledkem. U této odrůdy (byly odebrány 4 vzorky z každé metody, celkem 12 vzorků) byla u všech 3 metod prokázána přítomnost patogenu, a to u celkem 6 testovaných rostlin.

Přítomnost fytoplazmy pomocí metody real-time PCR byla prokázána u **metody číslo 1**, kde testovaná rostlina (vzorek G 5) (Přílohy, Obr. 23) byla zcela bez typických příznaků proliferace, u **metody číslo 2** byla 1 rostlina (vzorek R-G 8) bez typických příznaků onemocnění a 1 rostlina (vzorek R-G 10) vykazovala zakrslý růst. Stejně tak 1 rostlina (vzorek S-G 2) u **metody číslo 3** byla zakrslého růstu a další 2 rostliny (vzorky S-G 3 a S-G 8) byly zcela bez příznaků. Tato odrůda byla poškozená mšicemi (Tab. 7).

Tab. 7 Srovnání výsledků hodnocení výskytu fytoplazmy ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ pomocí metody real-time PCR a biologického indexingu u odrůdy ‘Gascoigneho’.

Odrůda ‘Gascoigneho’	Výsledky metody PCR ¹⁾	Výsledky metody real-time PCR (hodnota Ct) ²⁾	Metody inokulace	Výsledky metody biologického indexingu - hodnocení příznaků u jednotlivých testovaných rostlin
matečná rostlina	+	-		
roubovanec únor	+	34,24		
vzorek G 10	-	-	<u>metoda 1</u>	bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek G 2	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek G 3	-	-		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek G 5	+	34,64		bez příznaků
vzorek R-G 5	-	-	<u>metoda 2</u>	bez příznaků
vzorek R-G 8	PP	35,05		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek R-G 9	-	-		bez příznaků
vzorek R-G 10	+	34,42		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-G 2	+	33,68	<u>metoda 3</u>	zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-G 3	+	34,25		bez příznaků, poškozená mšicemi
vzorek S-G 6	-	-		zakrslý růst, poškozená mšicemi
vzorek S-G 8	PP	37,45		bez příznaků

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: 1) (+) míra koncentrace fytoplazmy v rostlině; (-) nepřítomnost fytoplazmy v rostlině 2) čím nižší je hodnota Ct (nižší číslo), tím větší je množství fytoplazmy v rostlině, PP potenciálně podezřelá

Ze 60 odebraných vzorků (náhodný výběr) byla pomocí metody real-time PCR prokázána přítomnost patogenu ve 12 případech (20 %). Z těchto 12 testovaných rostlin bylo 6 rostlin odrůdy ‘Gascoigneho’ (50%), tři rostliny odrůdy ‘Ribstonské’ (25 %), 2 rostliny odrůdy ‘Boskoopské’ (16,67 %) a 1 rostlina odrůdy ‘Panenské české’ (8,33 %).

Největší úspěšnost přenosu patogenu byla prokázána u odrůdy ‘Gascoigneho’, a to zejména pomocí **metody číslo 3**, u které byly pozitivně vyhodnoceny 3 testované vzorky ze 4 odebraných vzorků. U **metody číslo 2** byla fytoplazma přenesena 2 případech a u **metody číslo 1** v 1 případě.

U odrůdy ‘Ribstonské’ se projevila nejvyšší úspěšnost inokulace u **metody číslo 1**, zatímco u **metody číslo 2** nebyl přenos dosud laboratorními testy potvrzen. U odrůdy ‘Kanadská reneta’ přenos zatím nebyl potvrzen u žádné z metod. U odrůdy ‘Boskoopské’ se podařilo potvrdit přenos u 1 rostliny inokulované **metodou číslo 1** a 1 rostliny inokulované **metodou číslo 2**. U odrůdy ‘Panenské české’ se prokázal přenos u 1 rostliny inokulované **metodou číslo 3**.

5.7 Porovnání jednotlivých metod

U **metody číslo 1** a **metody číslo 2** nedošlo k výskytu příznaků u 34 respektive 35 testovaných rostlin, zatímco u **metody číslo 3** nebyly příznaky choroby patrné jen u 20 rostlin (rostliny se jeví jako bezpříznakové).

V případě **metody číslo 2** bylo zjištěno nejvíce podezřelých testovaných rostlin (celkem 8 testovaných rostlin), naopak u **metody číslo 1** bylo zaznamenáno nejméně podezřelých rostlin (celkem 4 testované rostliny). Zakrslý růst byl nejčastěji zaznamenán u **metody číslo 3** (21 testovaných rostlin), zatímco u **metody číslo 2** bylo nalezeno pouze 5 zakrslých rostlin. U **metody číslo 1** byly testované rostliny extrémně napadeny mšicemi ve 13 případech, oproti tomu u **metody číslo 2** jen v 8 případech.

U odrůdy 'Panenské české' bylo vyhodnoceno 7 bezpříznakových rostlin v případě **metody číslo 1**, 6 bezpříznakových rostlin v případě **metody číslo 2** a jen 4 bezpříznakové rostliny v případě **metody číslo 3**. U **metody číslo 3** bylo extrémně napadeno mšicemi 7 rostlin, u **metody číslo 1** pouze 1 rostlina. Zhuštěný vrchol vykazovaly 2 rostliny u **metody číslo 2**, chlorotizace byla zaznamenána u 2 rostlin u **metody číslo 3**.

Zcela bezpříznakové se jeví testované rostliny odrůdy 'Kanadská reneta' v 9 případech u **metody číslo 1**, v 6 případech u **metody číslo 2** a ve 3 případech u **metody číslo 3**. Mšicemi byly nejvíce napadeny rostliny u **metody číslo 2** (v 6 případech), nejméně u **metody číslo 3** (ve 3 případech).

U odrůdy 'Gascoigne' u **metody číslo 1** neprojevovalo vůbec žádné příznaky proliferace 6 testovaných rostlin, u **metody číslo 2 a 3** to bylo 7 testovaných rostlin. I v porovnání s ostatními odrůdami byly testované rostliny odrůdy 'Gascoigne' nejméně napadeny mšicemi. Zakrslý růst vykazovaly nejvíce rostliny u **metody číslo 1** (ve 4 případech), u **metody číslo 2** to bylo jen v 1 případě. V případě **metody číslo 2** uhynulo nejvíce rostlin nebo nevyrašilo očko indikátorové odrůdy (shodně 1 rostlina).

U odrůdy 'Ribstonské' nebyly patrné příznaky u **metody číslo 1** v 6 případech, u **metody číslo 2** v 8 případech a u **metody číslo 3** ve 2 případech. Mšicemi byly napadeny nejvíce rostliny u **metody číslo 2** (10 rostlin), u dané metody testované rostliny také měly zakrslý růst (5 rostlin). V případě **metody číslo 1** uhynuly 2 rostliny, u **metody číslo 2** uhynula 1 rostlina. U **metody číslo 3** neuhynula žádná rostlina. Zhuštěný vrchol se neobjevil u žádné testované rostliny této odrůdy. U 1 rostliny byla

patrna chlorotizace listů.

Odrůda 'Boskoopské' byla bezpříznaková v 6 případech u **metody číslo 1**, v 8 případech u **metody číslo 2** a ve 4 případech u **metody číslo 3**. Mšicemi bylo extrémně napadeno 5 testovaných rostlin u **metody číslo 1**, 1 testovaná rostlina u **metody číslo 2** a 7 testovaných rostlin u **metody číslo 3**. U **metody číslo 3** byl pozorován na 1 rostlině zhuštěný vrchol, 1 rostlina uhynula a na 1 rostlině nevyrašilo očko indikátorové odrůdy.

Na základě metody real-time PCR (celkem testováno 60 rostlin, od každé metody 20 rostlin) byl u **metody číslo 1** prokázán přenos u 20 % testovaných rostlin (odrůda 'Boskoopské' (vzorek B 10), odrůda 'Ribstonské' (vzorky R 4 a R 10) a odrůda 'Gascoigneho' (vzorek G 5). Nejnižší procento přenosu (15 %) bylo potvrzeno u **metody číslo 2**, jednalo se o rostliny odrůd 'Boskoopské' (vzorek R-B 3) a 'Gascoigneho' (vzorky R-G 8 a R-G 10). Naopak nejvyšší procento přenosu (25 %) bylo zaznamenáno u **metody číslo 3**, a to u odrůd 'Panenské české' (vzorek S-PČ 4), 'Ribstonské' (vzorek S-R 10) a 'Gascoigneho' (vzorky S-G 2, S-G 3 a S-G 8).

Pomocí metody real-time PCR bylo prokázáno, že nejméně úspěšným způsobem inokulace fytoplazmy byla **metoda číslo 3**, a to u 8,33 % testovaných rostlin. **Metoda číslo 1** byla na základě experimentu vyhodnocena jako druhá nejméně úspěšná. Touto metodou bylo inokulováno 6,67 % testovaných rostlin. **Metodou číslo 2** bylo inokulováno jen 5 % testovaných rostlin, což bylo nejméně v rámci všech použitých metod.

6. Diskuze

Předmětem diplomové práce byla optimalizace postupu detekování fytoplazmy 'Candidatus fytoplasma mali' pomocí dřevinných indikátorů jako alternativy k molekulárním metodám (real-time PCR). V rámci založeného experimentu byly na testovaných rostlinách různých odrůd jableň ('Panenské české', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneo', 'Ribstonské' a 'Boskoopské') porovnány 3 různé způsoby přenosu fytoplazmové infekce: metoda podvojného roubování v zimě testované odrůdy a indikátoru na semenáč (**metoda číslo 1**), metoda letního očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v zimě v ruce na semenáč (**metoda číslo 2**) a metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč (**metoda číslo 3**).

Vzhledem k časovému omezení období realizace této studie bylo zjišťováno, zda přítomnost příznaků na testovaných rostlinách může nastat již během rašení a krátce po něm. Současně se hodnotila možnost detekování fytoplazmy biologickým indexem v očku letním nebo zimním roubu (vliv vnějších teplot a vegetační fáze rostliny).

Podobně se problematikou přenosu patogenu (fytoplazmy) u jableň podrobněji zabýval SEIDL (1973), který zdůraznil, že na přenos infekce může mít vliv výběr **partie (část) rostliny** rozmnožovacího materiálu, **termín odběru** oček a roubov a **termín očkování**.

Ve studii SEIDL (1973) byla všechna očka testovaných odrůd odebrána z jableň, u kterých byla prokázána přítomnost patogenu laboratorními testy. Tento autor uvádí, že detekovatelnost fytoplazmy je ve značné míře ovlivněna výběrem **partie (části) rostliny**, ze které jsou očko nebo roub odebrány. K závěru dospěl na základě experimentu provedeného v roce 1966, kdy rozočkoval silně infikovaný strom odrůdy 'Boskoopské červené', kdy z 8 sousedních oček téhož letorostu pouze jediné infikovalo podnož.

Obdobně v předkládané diplomové práci byla u odrůdy 'Panenské české' použita očka z výhonu, který vykazoval typické příznaky proliferace (Přílohy, Obr. 7). Očka této odrůdy byla inokulována na testované rostliny **metoda číslo 2** a **metodou číslo 3**. V případě použití **metody číslo 2** nebyla prokázána přítomnost patogenu ani u 1 testované rostliny; u **metody číslo 3** byl patogen detekován u 1 testované rostliny, a to jen díky laboratorním testům (real-time PCR), protože ani tato 1 pozitivní rostlina nevykazovala typické příznaky onemocnění.

Dále je ve studii SEIDL (1973) uvedeno, že u testovaných rostlin, které byly

inokulovány **rouby odebranými ve vegetačním klidu**, se přenos patogenu nepodařilo prokázat. Pokud se jedná o ovlivnění přenosu choroby různě termínovaným odběrem infekčního materiálu, tak tato práce potvrzuje hypotézu, že koncentrace patogenu v nadzemních částech rostlin je během vegetace vyšší oproti jeho koncentraci v materiálu odebraném v období vegetačního klidu. Pomocí metody real-time PCR bylo prokázáno, že nejúspěšnějším způsobem inokulace fytoplazmy byla **metoda číslo 3** (metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč). Očka byla odebrána při teplotě 20 °C, což mohlo značně ovlivnit úspěšnost této metody. **Metoda číslo 1**, která byla zaměřena na inokulaci rostinného materiálu pomocí zimních roubů, byla v této práci vyhodnocena až jako druhá nejúspěšnější.

SEIDL (1973) ve svých pracech dále uvádí, že se fytoplasma v zimních měsících stahuje do kořenů. Pro účely této diplomové práce byl použit infekční rostlinný materiál (roub), který byl odebrán v lednu, kdy se teplota vzduchu pohybovala kolem 4 °C. Proto lze předpokládat, že koncentrace fytoplazmy v den odběru infekčního rostlinného materiálu mohla být vyšší, než v jiném zimním období (díky extrémně nízkým teplotám v zimním období může roub obsahovat méně fytoplazmy než letní očko). Naopak zde může působit i fakt, že roub infikované rostliny by mohl teoreticky obsahovat větší množství fytoplazmy než letní očko odebrané za velmi vysokých teplot, což se v této diplomové práci nepotvrdilo, protože jak již bylo v kapitole č. 4.3.2. uvedeno, letní očko infekčního rostinného materiálu bylo odebráno za teplot 20 °C. Proto lze konstatovat, že vše závisí na teplotách vzduchu během odběru vzorků.

Na přenos choroby očkem může mít značný vliv také **termín očkování**. SEIDL (1973) ve svém pokusu provedl očkování v druhé dekádě měsíce července, v první dekádě měsíce srpna a v první dekádě měsíce září. U 65,2 % případů byl stupeň přenosu tím větší, čím později bylo očkování realizováno. Z provedených pokusů nelze jednoznačně tuto hypotézu potvrdit, a to z toho důvodu, že inokulace byla realizována pouze v jediném termínu.

Kvantitu fytoplazmy při odběrech roubů či oček tedy významně ovlivňují tyto faktory: **citlivost testované odrůdy** (čím citlivější odrůda, tím vyšší kvantita fytoplazmy při odběru), **místo odběru** rozmnožovacího materiálu, **termín odběru** oček a roubů a **teplota** při odběru oček. Další významný faktor, který měl vliv na vývoj experimentu byl **vývoj teplot při pěstování** inokulovaných experimentálních rostlin. V roce 2015 byly naměřeny nadprůměrně vysoké dlouhotrvající teploty během

léta i podzimu, přičemž tyto vysoké teploty mohly mít za následek snížení (omezení) tendence množení fytoplazmy v pletivech.

V letech 2001–2004 byla ve VŠÚO Holovousy s. r. o. prováděna studie, jejíž výsledky prokázaly pomocí molekulárních metod PCR a RFLP přítomnost fytoplazmy v lýkové části kořenů po celý rok, přičemž průměrným vzorkem byly 4 řízky odebrané po celém obvodu kořenového systému. Jako nejvhodnější průměrný vzorek pro spolehlivou detekci z nadzemních částí se jeví lýko 4 roubů dvouletého dřeva odebíraných buď ze symptomatické části rostliny a nebo ze spodní či střední partie koruny. Během teplých letních měsíců byla fytoplazma v nadzemních částech hůře detekovatelná (Kučerová *et al.*, 2005).

Podobný závěr byl potvrzen během výzkumu prováděného v roce 2014, kdy bylo zjištěno, že koncentrace fytoplazmy v nadzemních částech infikované rostliny 'Golden Delicious' byla nižší ve vzorcích odebraných během května a dalších letních měsíců, kdy byly zaznamenány dlouhodobé vysoké teploty vzduchu. Oproti tomu kvantita fytoplazmy ve vzorcích odebraných v měsíci březnu vykazovala vyšší hodnoty (CHRISTEN *et al.*, 2016).

Díky využití laboratorních metod real-time PCR bylo zjištěno, že morfologické změny, zaznamenané na výhonech idikátoru Vf 'Golden Delicious' po narašení zřejmě nebyly typické příznaky přítomnosti fytoplazmy. I když byla přítomnost fytoplazmy v některých rostlinách potvrzena, její koncentrace byla velice nízká. Rostliny, jejichž vzorky vykazovaly negativní reakci mohou přesto částice fytoplazmy obsahovat, a to v jiných částech rostliny, než ze kterých byly vzorky odebírány, nicméně ve velmi nízké koncentraci.

BARIC *et al.* (2011) s využitím metody Taq real-time PCR potvrdili, že exprese symptomů v nadzemních částech vzniká až při určitém množství 'Candidatus Phytoplasma mali' v rostlinné tkáni. Tyto výsledky poukazují na skutečnost, že období trvání experimentu nezajistilo potřebné namnožení fytoplazmy v pletivech tak, aby se projevíly příznaky. Tímto byla potvrzena hypotéza, že testování přítomnosti fytoplazmy pomocí krátkodobých skleníkových testů, které se provádějí např. u virových patogenů jabloně (OEPP/EPPO, 2001), není spolehlivé a doporučuje se pozorovat testovací rostliny minimálně dvě vegetační období, pokud možno v podmínkách, kde lze zabránit extrémně vysokým teplotám (např. polní testy, skleníky s možností řízení teploty).

7. Závěr

Předmětem diplomové práce byla optimalizace postupu detekování fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí dřevinných indikátorů jako alternativy k molekulárním metodám (real-time PCR). V rámci založeného experimentu byly na testovaných rostlinách různých odrůd jableň ('Panenské české', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneho', 'Ribstonské' a 'Boskoopské') porovnány 3 různé způsoby přenosu fytoplazmové infekce: metoda podvojného roubování v zimě testované odrůdy a indikátoru na semenáč (**metoda číslo 1**), metoda letního očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v zimě v ruce na semenáč (**metoda číslo 2**) a metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč (**metoda číslo 3**).

Experiment trval 10 měsíců. Během pozorování se na indikátoru neprojevily typické příznaky choroby ani u jedné rostliny v žádné variantě. Ve 12 indikátorových rostlinách byla potvrzena přítomnost fytoplazmy pomocí metody real-time PCR, nejvíce v rostlinách, na kterých byla testována odrůda 'Gascoigneho' a které byly založeny metodou dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč (**metoda číslo 3**). Ze získaných výsledků lze odvodit, že nejúspěšnější inokulaci indikátoru během experimentu zajistila **metoda číslo 3**.

Nepřítomnost typických příznaků a nízká koncentrace fytoplazmy v pozitivních vzorcích potvrzuje, že biologické testování přítomnosti fytoplazmy pomocí krátkodobých skleníkových testů není spolehlivé a doporučuje se pozorovat testované rostliny minimálně dvě vegetační období, pokud možno v podmínkách, kde lze zabránit extrémně vysokým teplotám (např. polní testy, skleníky s možností řízení teploty).

Vzhledem ke skutečnosti, že období realizace této studie nebylo dostatečně dlouhé pro získání konečného hodnocení zdravotního stavu testovaných rostlin (tj. přítomnosti fytoplazmy v rostlinách), bude nutné rostliny i nadále sledovat. Z toho důvodu budou konečné výsledky k dispozici na konci příštího vegetačního období (podzim 2017), které nicméně již přesahuje časový rámec stanovený pro uskutečnění pokusu předkládané diplomové práce.

8. Souhrn a Resume

Diplomová práce se zabývala optimalizací postupu detekce fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*' pomocí dřevinného indikátoru 'Golden Delicious' ve skleníkových podmínkách jako alternativy testování přítomnosti fytoplazmy biologickým indexingem v podmínkách polních. Ke kontrole přítomnosti fytoplazmy v pokusných rostlinách byla během práce využita molekulární metoda real-time PCR. Pokus byl založen na demonstrační ploše Ústavu šlechtění a množení zahradnických rostlin v areálu Mendelovy univerzity v Brně.

Byly porovnány 3 metody přenosu fytoplazmy: metoda podvojného roubování testované odrůdy a indikátoru na semenáč v období vegetačního klidu, metoda letního očkování testované odrůdy na indikátor roubovaný v období vegetačního klidu na semenáč a metoda dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč. Na dřevinném indikátoru 'Golden Delicious' byly testovány odrůdy 'Panenské české', 'Kanadská reneta', 'Gascoigneho', 'Ribstonské' a 'Boskoopské' od každé odrůdy 10 rostlin. Experiment trval 10 měsíců.

Vizuální kontrolou přítomnosti symptomů bylo hodnoceno celkem 150 testovaných rostlin. Během hodnocení testů nebyly ani na jedné testované rostlině monitorovány specifické symptomy fytoplazmové proliferace jabloně. Přítomnost '*Candidatus Phytoplasma mali*' byla ověřena metodou real-time PCR na 60 testovaných (indikátorových) rostlinách. Infekce patogenem byla potvrzena ve 12 indikátorových rostlinách. Zjištěné kvantify fytoplazmy v pletivech však dosahovaly velmi nízké hodnoty. Nejvyšší počet infikovaných rostlin vykazovaly testy odrůdy 'Gascoigneho', založené metodou dvojitého letního očkování indikátoru a testované odrůdy na semenáč. Tato metoda zajistila nejúspěšnější inokulaci indikátoru fytoplazmou.

Na základě výsledků získaných během prováděné studie lze tvrdit, že biologické testování přítomnosti fytoplazmy pomocí krátkodobých skleníkových testů není spolehlivé. Zároveň je doporučeno testování pomocí indikátoru 'Golden Delicious' realizovat po dobu minimálně dvou vegetačních období, jak je tomu u polních testů. Vzhledem k tomu, že během časově omezeného období realizace experimentu v této diplomové práci bylo zjištěno, že nedošlo k dostatečnému namnožení fytoplazmy v rostlinách, budou vypovídající výsledky porovnání metod inokulace indikátorových rostlin k dispozici na konci podzimu 2017.

Klíčová slova: ‘*Candidatus phytoplasma mali*’, fytoplazma proliferace jabloně, biologické testování, real-time PCR, indikátor, jabloně

A subject of the diploma thesis was the optimization of a procedure of detecting a phytoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ using woody indicator ‘Golden Delicious’ in greenhouse conditions as an alternative method to the phytoplasma presence testing by biological indexing in field conditions. To control the presence of phytoplasma in the experimental plants, molecular method of real-time PCR was used. The experiment was set up on the demonstration area of the Department of Breeding and Propagation of Horticultural Plants in the grounds of Mendel University in Brno.

Three different ways of transferring of the phytoplasma infection were compared: method of parallel grafting of the tested variety and of the indicator on the seedling in the period of dormancy (**method number 1**), method of summer budding of the tested variety on indicator grafted on the seedling in the period of dormancy (**method number 2**), and method of double summer budding of the indicator and of the tested variety on the seedling (**method number 3**). On a woody indicator ‘Golden Delicious’, varieties ‘Virgin Czech’, ‘Canadian rennet’, ‘Gascoigne’, ‘Ribston’ and ‘Boskoop’ were tested, 10 plants of each variety. The experiment lasted 10 months.

A total of 150 tested plants were assessed by a visual inspection of the symptoms presence. During the monitoring period, none of the tested plants showed typical symptoms of the apple proliferation. Presence of the ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ was verified using real-time PCR method in 60 tested (indicator) plants. The infection was confirmed in 12 of the indicator plants. The detected quantities of the phytoplasma in the tissues however reached very low values. The highest number of the infected plants was found in tests of the Gascoigne variety, established by the method of double summer budding of the indicator and of the tested variety on the seedling (**method number 3**). This method provided the most successful inoculation of the indicator by the phytoplasma.

Based on the results obtained during the presented study, it can be declared that biological testing of the phytoplasma presence using short-term greenhouse tests is not reliable. When using testing with the indicator ‘Golden Delicious’, it is recommended to realize the experiments for at least two growing seasons,

as it is in the field tests. Due to the fact that during the time-limited realization period of the experiment in this study it was found that the phytoplasma was not sufficiently propagated, the final results of the comparison of the indicator plants inoculation methods will be available at the end of autumn of 2017.

Keywords: ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, apple proliferation phytoplasma, biological testing, real-time PCR, indicator, apples

9. Seznam použité literatury a elektronických zdrojů

1. BALÍK, J., *et al.* Assessment of nutritional parameters of native apple cultivars as new gene sources. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2013, 60.5: 27-38.
2. BARIC, S., *et al.* Advances in detection of apple proliferation phytoplasma. *Advances in Plant Biotechnology*, 2008, 561-582.
3. BARIC, S., *et al.* Seasonal colonisation of apple trees by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 129.3: 455-467.
4. BOONROD, K., *et al.* An immunodominant membrane protein (Imp) of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ binds to plant actin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25.7: 889-895.
5. BLAŽEK, J. *Ovocnictví*. 2., nezměn. vyd. Praha: Květ, 1998. ISBN 80-85362-43-0.
6. BLUMER, S., *et* BOVEY, R. Über den virosen Besenwuchs an Apfelbäumen (Proliferation virus). 1957, *Phytopathologie*. Z.30: 237.
7. BROTON, J. ÚSTAV AGROSYSTEMŮ A BIOKLIMATOLOGIE, MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *Úhrn tepolot a srážek za období od 1. 6. 2015 do 31. 1. 2016*. 2016.
8. BRZIN, J., *et al.* Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees/Nachweis des Apfeltriebsucht-Phytoplasmas durch ELISA und PCR in wachsenden und ruhenden Apfelbäumen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 2003, 476-483.
9. BULGARI, D., *et al.* Endophytic bacterial community living in roots of healthy and ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ - infected apple (*Malus domestica*, Borkh.) trees. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 102.4: 677-687.
10. CARRARO, L., *et al.* Transmission of the possible agent of apple proliferation to *Vinca rosea* by dodder. *Rivista di patologia vegetale*, 1988, 43-52.
11. CARRARO, L., *et al.* Infectivity of *Cacopsylla picta* (syn. *Cacopsylla costalis*), vector of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in north east Italy. *Acta Horticulturae*. 2008, roč. 781, s. 403-407.
12. CIEŚLIŃSKA, M., *et* MORGÁŠ, H. Detection and identification of ‘*Candidatus*

Phytoplasma prunorum', 'Candidatus Phytoplasma mali' and 'Candidatus Phytoplasma pyri' in stone fruit trees in Poland. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159.4: 217-222.

13. DVOŘÁK, A., et VONDRÁČEK J. *Jablka*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1969, 336 s.

14. EMBER, I., et al. Identification of phytoplasmas on pomaceous fruit tree species in Hungary. *Acta Horticulturae*, 2004.

15. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) 1991/2975. Scheme for the production of certified virus-free or virus-tested fruit trees and rootstocks.

16. EPPO/CABI: Certification scheme for *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *EPPO Bulletin*. 2001, vol. 31, issue 4, s. 445-446. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2001.tb01026.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2338.2001.tb01026.x>

17. EPPO/CABI: PQR database. Paris, France: *European and Mediterranean Plant Protection Organization Webpages* [online]. 2015 [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>

18. FRÁNOVÁ, J., et al. Genetic diversity of Czech 'Candidatus Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*. 2013, roč. 136, č. 4, s. 675-688.

19. FRÁNOVÁ, J., et al. Phytoplasma diseases and their vectors in Czech Republic, Hungary and Poland. *Phytoplasmas and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*, 2014, 29.

20. FRÁNOVÁ, J., et al. Genetic diversity of Czech 'Candidatus Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 136.4: 675-688.

21. HUSS, S. Apple proliferation (AP). In: *IAM Plant Biotech Unit, Plant Pathology Webpages* [online]. 2001 [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: http://www.boku.ac.at/iam/pbiotech/phytopath/v_ap.html

22. CHIRECEANU, C., et FĂȚU, V. Data on the Hawthorn Psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Förster) Populations in Southeast Romania. *Ecologia Balkanica*, 2012, 4.2.

23. CHRISTEN, D., et al. *Evaluation of factors determining distribution, impact, detection and characterization of fruit tree phytoplasmoses (APOPHYT)*. 2016.

24. JARAUSCH, B., et al. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple

- proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Disease*, 2003, roč. 87, č. 1, s. 101-101.
25. JARAUSCH, B., *et al.* *Cacopsylla picta* as most important vector for ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology*, 2007, 60.2: 189-190.
 26. KARTTE, S., *et SEEMÜLLER*, E. Variable response within the genus *Malus* to the apple proliferation disease/Unterschiedliche Reaktion auf die Apfelfriebsucht innerhalb der Gattung *Malus*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 1988, 25-34.
 27. KOHOUT, K. *Jablka*. Vyd. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství ve spolupráci s Československým svazem zahrádkářů a ovocnářů v Praze, 1960, 270 s.
 28. KUBE, M., *et al.* The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics*, 2008, 9.1: 306.
 29. KUČEROVÁ, J., *et al.* (2005). První výsledky sledování dynamiky výskytu fytoplazmy proliferace jabloně (AP) v jabloních během vegetačního období. *Vědecké práce ovocnářské*, 19, s:97-104.
 30. KVIČERA, V., *et NOVÁKOVÁ*, J. *Výsledky detekčního průzkumu škodlivých organismů v ČR za rok 2007*. 2008. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/69613/Detekcni_pruzkumy_2007.pdf
 31. KYNCL, F. *Ovocinárstvo: učebný text pre stred. poľnohosp. techn. školy štud. odb. 42-11-6 Záhradníctvo*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1980, 433 s. Rostlinná výroba (Príroda).
 32. LENZ, O. *Real-time PCR - detekce rostlinných patogenů* [online]. BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR V.V.I. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: https://www.email.cz/download/k/GnLFaewoFm3zs8x0H2PeDvxN24sp6bUJ_HsBTCxG2QrWN58niWfIjOrZLOP2ZThvM_FE-z8/RealTime.pdf
 33. MARCONE C., *et al.* 1996. Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant Pathology*45, 857–63.
 34. MATTEDI, L., *et al.* Research on ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ transmission by insect vectors in Trentino. In: *XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 781*. 2006. p. 369-374.
 35. MALAGNINI, V., *et al.* Differences among *Cacopsylla melanoneura* Förster (Homoptera: Psyllidae) insight from molecular markers. 2010, *IOBC/WPRS Bulletin*.54: 25. handle: <http://hdl.handle.net/10449/20350>

36. MARTINI, M., *et al.* Molecular differentiation of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and its spreading in Friuli Venezia Giulia region (North-East Italy). In: *XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 781*. 2006. p. 395-402.
37. MATTEDI, L., *et al.* Research on ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ transmission by insect vectors in Trentino. In: *XX International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases 781*. 2006. p. 369-374.
38. MAYER, C. J., *et* GROSS J. Different host plant odours influence migration behaviour of *Cacopsylla melanoneura* (Forster), an insect vector of the apple proliferation phytoplasma. *IOBC WPRS BULLETIN*, 2007, roč. 30, č. 4, s. 177.
39. MEHLE, N., *et al.* First report of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant Pathology*. 2007, roč. 56, č. 4, s. 721-721.
40. MORVAN, G., *et* CASTELAIN C. Nouvelles observations sur la sensibilité de *Malus x dawsoniana* à la maladie de la prolifération du pommier et sur son utilisation comme indicateur. *Acta Horticulturae*. 1975, roč. 44, s. 175-182.
41. MAYER, Ch. J., *et al.* Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34.8: 1045-1049.
42. NAVRÁTIL, M., *et* FIALOVÁ R. *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. V Olomouci: Univerzita Palackého ve spolupráci s Českou fytopatologickou společností, 2008, 147 s., [6] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-903545-2-4.
43. NÉMETH, M. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Lancaster, Boston, 1986, USA/Dordrecht, Netherlands: M. Nijhoff Publishers, 841 pp.
44. OEPP/EPPO (2001), Standards PM 4/27. Certification scheme for *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 31, 445-446.
45. OETTL, S., *et* SCHLINK, K. Molecular Identification of Two Vector Species, *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae), of Apple Proliferation Disease and Further Common Psyllids of Northern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 2015, tov204.
46. PEKÁRKOVÁ, J., *et* RŮŽIČKA, T. *Výsledky detekčního průzkumu výskytu škodlivých organismů v ČR za rok 2012*. 2013. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/257701/Vysledky_detekcnich_pruzkumu_2012_publicace.pdf
47. PEŠEK, R. *Staré odrůdy.org: Ovocná školka Bojkovice* [online]. [cit. 2016-02-14].

Dostupné z: <http://www.stareodrudy.org/ovocny-strom/jaderni%C4%8Dka-moravsk%C3%A1/8.html>

48. RAZIN, S. (1992). Mycoplasma taxonomy and ecology, p. 3-22. In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. Baseman (ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology*. Washington, D.C.
49. RICHTER, M. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce*. Vyd. 1. Lanškroun: TG tisk, 2004, 130 s. ISBN 80-903487-3-4.
50. RŮŽIČKA, T., et PEKÁRKOVÁ J. *Výsledky detekčního průzkumu výskytu škodlivých organismů v ČR za rok 2013*. 2014. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/340925/vysledky_detekcnich_pruzkumu_2013.pdf
51. ŘEZNÍČEK, V. EVIDENCE VÝSKYTU STARÝCH A KRAJOVÝCH ODRŮD VE VYBRANÝCH LOKALITÁCH ČR RECORDING THE OCCURRENCE OF OLD AND REGIONAL VARIETIES IN SELECTED LOCALITIES OF THE CZECH REPUBLIC. NOVÉ POZNATKY Z GENETIKY A ŠLACHTENIA POĽNOHOSPODÁRSKYCH RASTLÍN, 91.
52. SEEMÜLLER, E., et SCHNEIDER, B. ‘*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*, 2004, 54.4: 1217-1226.
53. SEEMÜLLER, E., et al. Apple proliferation phytoplasma. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, ed. by Hadidi A., Barba, M. Candresse, T. & W. Jelkmann, APS-Press, 2011, 67-73.
54. SELJAKB, G., et RAVNIKARA, M. First report of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant Pathology*, 2007, 56: 721.
55. SEIDL, V. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ, VÝZKUMNÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY. *Studium virové proliferace jabloně*. VÚOv Holovousy, 1966. Číslo úkolu: 207-2/50.
56. SEIDL, V. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ, VÝZKUMNÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY. *Výzkum nejdůležitějších virůz a mykoplazmóz jádovin 1971 – 1973: Výzkum proliferace jabloně a virové drsnosti slupky jablek*. VÚOv Holovousy, 1973. Číslo úkolu: P 11–329–055–04.
57. SCHLESINGEROVÁ, G., ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’: Proliferace jabloně.

2011. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/139699/proliferace_jablone.pdf.
- 58.** SCHAPER, U., *et* SEEMÜLLER, E. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*, 1982, 72: 736-742.
- 59.** SCHNEIDER, B., *et al.* Suppression of aggressive strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' by mild strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and indication of similar action in apple trees. *Phytopathology*, 2014, 104.5: 453-461.
- 60.** SLETTEN, A., *et al.* Pest risk assessment for apple proliferation phytoplasma ('Candidatus *Phytoplasma mali*'). 2011. Dostupné také z: <http://www.vkm.no/dav/cccfc877e4.pdf>
- 61.** SRS. Rozsah a výsledky cíleného průzkumu výskytu škodlivých organismů v ČR za rok 2005. 2006. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/75942/Cilene_pruzkumy_2005.pdf
- 62.** SRS. Rozsah a výsledky cíleného průzkumu výskytu škodlivých organismů v ČR za rok 2006. 2007. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/75944/Cilene_pruzkumy_2006.pdf
- 63.** STRACHOVÁ, H. Výsledky detekčního průzkumu škodlivých organismů v ČR za rok 2009. 2010. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/file/90191/Detekcni_pruzkumy_SO_v_CR_2009.pdf
- 64.** SUCHÝ, F. *Moravské ovoce*. 2. dopl. vyd. Brno, 1931. Knihovnička České zemědělské rady v Brně.
- 65.** TEDESCHI, R., *et* ALMA, A. *Fiebertiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of 'Candidatus *Phytoplasma mali*'. *Plant Disease*, 2006, 90.3: 284-290.
- 66.** TEDESCHI, R., *et al.* Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 123.3: 301-310.
- 67.** ÚKZÚZ. Zpráva o činnosti ÚKZÚZ za rok 2014 [online]. 2015. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/422099/Vyrocnizprava_UKZUZ_2014.pdf
- 68.** URBAN, V. *Škola ovocnáře*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1986, 329 s., barev. obr. příl. Rostlinná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- 69.** WOOD, G. A. "A system for propagating and virus-screening imported pome fruit and stone fruit cultivars under cross-hemisphere conditions." *New Zealand Journal*

of Crop and Horticultural Science 17.2 (1989): 169-173.

70. ZAWADZKA, B., *et* KAMINSKA, M. The influence of oxytetracycline on the appearance of apple proliferation symptoms. In: IX International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases 44. 1973. p. 19-22.

71. ZHAO, Y., *et al.* 'Candidatus Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59.10: 2496-2504.

72. ZIMMERMANN, M. R., *et al.* Implications of 'Candidatus Phytoplasma mali' infection on phloem function of apple trees. *Endocytobiosis and Cell Research: Journal of the International Society of Endocytobiology*, 2015, 26: 67-75.

Osobní sdělení

SUCHÁ J., Ing., Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy

10. Seznam použitých zkratek

AP	apple proliferation, fytoplazma proliferace jabloně
CTAB	cetyl trimethylammonium bromide, cetyltrimethylamoniombromid
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DO	dvojitě očkování
DR	dvojitě roubování
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization, Evropská a Středozevní organizace ochrany rostlin
JO	jednoduché očkování
JR	jednoduché roubování
KT	kořenová metoda
NDR	Německá demokratická republika
nested PCR	Nested Polymerase Chain Reaction
O	očko
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
PD	pear decline, chřadnutí hrušně
PP	potencionálně podezřelá
real-time PCR	real-time Polymerase Chain Reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RFLP	restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RI	indikátorový roub
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SRN	Spolková republika Německo
SRS	Státní rostlinolékařská správa (<i>State Phytosanitary Administration</i>)
T1	terčík kůry na semenáč
T2	terčík kůry na starší strom
TR	testovaná rostlina
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
Vf	<i>virus free</i>
VŠÚO	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy

Přílohy

Seznam obrázků:

- Obr. 7 Metlovité výhony na odrůdě 'Panenské české'.
- Obr. 8 Příznaky fytoplazmové proliferace jabloně na dvouletém indikátoru 'Golden Delicious'.
- Obr. 9 Zvětšené palisty na odrůdě 'Golden Delicious'.
- Obr. 10 Pozdní kvetení jako příznak proliferace jabloně.
- Obr. 11 Experimentální plocha – venkovní prostory.
- Obr. 12 Experimentální plocha – skleník (jabloně po řezu).
- Obr. 13 Klasické očkování způsobem T-řezem provedené na odrůdě 'Ribstonské'.
- Obr. 14 Forkertovo očkování provedeno na odrůdě 'Kanadská reneta'.
- Obr. 15 Roubování anglickou kopulací na odrůdě 'Panenské české'.
- Obr. 16 Řez u metody číslo 2 provedený na odrůdě 'Ribstonské' (vzorek R-R 1).
- Obr. 17 Řez u metody číslo 3 provedený na odrůdě 'Boskoopské' (vzorek S-B 1).
- Obr. 18 Přístroj Rotor-Gene Q.
- Obr. 19 Testovaná rostlina 'Panenské české' (vzorek S-PČ 4).
- Obr. 20 Testovaná rostlina 'Boskoopské' (vzorek R-B 3).
- Obr. 21 Testovaná rostlina 'Ribstonské' (vzorek R 4).
- Obr. 22 Testovaná rostlina 'Kanadská reneta' (vzorek S-KR 3).
- Obr. 23 Testovaná rostlina 'Gascoigneho' (vzorek G 5).

Seznam tabulek:

- Tab. 8 Úspěšnost roubování a očkování u jednotlivých odrůd a použité zkratky u jednotlivých odrůd a metod.
- Tab. 9 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek PČ, metoda číslo 1).
- Tab. 10 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek KR, metoda číslo 1).

- Tab. 11 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigneo' (vzorek G, metoda číslo 1).
- Tab. 12 Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (vzorek R, metoda číslo 1).
- Tab. 13 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek B, metoda číslo 1).
- Tab. 14 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek R-PČ, metoda číslo 2).
- Tab. 15 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek R-KR, metoda číslo 2).
- Tab. 16 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigneo' (vzorek R-KR, metoda číslo 2).
- Tab. 17 Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (vzorek R-R, metoda číslo 2).
- Tab. 18 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek R-B, metoda číslo 2).
- Tab. 19 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek S-PČ, metoda číslo 3).
- Tab. 20 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek S-KR, metoda číslo 3).
- Tab. 21 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigneo' (vzorek S-G, metoda číslo 3).
- Tab. 22 Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (vzorek S-R, metoda číslo 3).
- Tab. 23 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek R-B, metoda číslo 3).



Obr. 7 Metlovité výhony na odrůdě 'Panenské české'.
Zdroj: archiv autora, 2015



Obr. 8 Příznaky fytoplazmové proliferace jabloně na dvouletém indikátoru 'Golden Delicious'.
Zdroj: SUCHÁ, 2016



**Obr. 9 Zvětšené palisty na odrůdě 'Golden Delicious'.
Zdroj: archiv autora, 2013**



**Obr. 10 Pozdní kvetení jako příznak proliferace jabloně.
Zdroj: archiv autora, 2013**



Obr. 11 Experimentální plocha – venkovní prostory.
Zdroj: archiv autora, 2015



Obr. 12 Experimentální plocha – skleník (jabloně po řezu).
Zdroj: archiv autora, 2015



Obr. 13 Klasické očkování způsobem T-řezem provedené na odrůdě 'Ribstonské'.
Zdroj: archiv autora, 2015



Obr. 14 Forkertovo očkování provedeno na odrůdě 'Kanadská reneta'.
Zdroj: archiv autora, 2015



**Obr. 15 Roubování anglickou kopulací na odrůdě 'Panenské české'.
Zdroj: archiv autora, 2015**



**Obr. 16 Řez u metody číslo 2 provedený na odrůdě 'Ribstonské' (vzorek R-R 1).
Zdroj: archiv autora, 2016**



Obr. 17 Řez u metody číslo 3 provedený na odrůdě 'Boskoopské' (vzorek S-B 1).
Zdroj: archiv autora, 2016



Obr. 18 Příklad Rotor –Gene Q.
Zdroj: SUCHÁ, 2016



Obr. 19 Testovaná rostlina 'Panenské české' (vzorek S-PČ 4).
Zdroj: archiv autora, 2016



Obr. 20 Testovaná rostlina 'Boskoopské' (vzorek R-B 3).
Zdroj: archiv autora, 2016



Obr. 21 Testovaná rostlina 'Ribstonské' (vzorek R 4).
Zdroj: archiv autora, 2016



Obr. 22 Testovaná rostlina 'Kanadská reneta' (vzorek S-KR 3).
Zdroj: archiv autora, 2016



Obr. 23 Testovaná rostlina 'Gascoigneho' (vzorek G 5).
Zdroj: archiv autora, 2016

Tab. 8 Úspěšnost roubování a očkování u jednotlivých odrůd a použité zkratky u jednotlivých odrůd a metod.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátoru	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Panenské české' 1	+	+	PČ 1	+	o	R-PČ 1	+	o	S-PČ 1
'Panenské české' 2	+	+	PČ 2	+	-	R-PČ 2	+	-	S-PČ 2
'Panenské české' 3	+	+	PČ 3	+	-	R-PČ 3	+	-	S-PČ 3
'Panenské české' 4	+	+	PČ 4	+	o	R-PČ 4	+	-	S-PČ 4
'Panenské české' 5	+	+	PČ 5	+	-	R-PČ 5	+	-	S-PČ 5
'Panenské české' 6	+	+	PČ 6	+	o	R-PČ 6	+	o	S-PČ 6
'Panenské české' 7	+	+	PČ 7	+	-	R-PČ 7	+	-	S-PČ 7
'Panenské české' 8	+	+	PČ 8	+	-	R-PČ 8	-	-	S-PČ 8
'Panenské české' 9	+	+	PČ 9	+	-	R-PČ 9	+	-	S-PČ 9

Pokračování Tab 8.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátor u	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Panenské české' 10	+	+	PČ 10	+	-	R-PČ 10	+	-	S-PČ 10
'Kanadská reneta' 1	+	+	KR 1	+	-	R-KR 1	+	-	S-KR 1
'Kanadská reneta' 2	+	+	KR 2	+	o	R-KR 2	+	-	S-KR 2
'Kanadská reneta' 3	+	+	KR 3	+	-	R-KR 3	+	-	S-KR 3
'Kanadská reneta' 4	+	+	KR 4	+	o	R-KR 4	+	+	S-KR 4
'Kanadská reneta' 5	+	+	KR 5	+	-	R-KR 5	+	-	S-KR 5
'Kanadská reneta' 6	+	+	KR 6	+	-	R-KR 6	+	-	S-KR 6
'Kanadská reneta' 7	+	+	KR 7	+	-	R-KR 7	+	+	S-KR 7
'Kanadská reneta' 8	+	+	KR 8	+	-	R-KR 8	+	-	S-KR 8

Pokračování Tab 8.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátoru	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Kanadská reneta' 9	+	+	KR 9	+	-	R-KR 9	+	+	S-KR 9
'Kanadská reneta' 10	+	+	KR 10	+	-	R-KR 10	+	+	S-KR 10
'Gascoigneo' 1	+	+	G 1	+	o	R-G 1	+	-	S-G 1
'Gascoigneo' 2	+	+	G 2	+	-	R-G 2	+	+	S-G 2
'Gascoigneo' 3	+	+	G 3	+	o	R-G 3	+	-	S-G 3
'Gascoigneo' 4	+	+	G 4	+	o	R-G 4	+	-	S-G 4
'Gascoigneo' 5	+	+	G 5	+	-	R-G 5	+	-	S-G 5
'Gascoigneo' 6	+	+	G 6	+	o	R-G 6	+	o	S-G 6
'Gascoigneo' 7	+	+	G 7	+	-	R-G 7	+	-	S-G 7

Pokračování Tab 8.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátoru	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Gascoigneho' 8	+	+	G 8	+	-	R-G 8	+	-	S-G 8
'Gascoigneho' 9	+	+	G 9	+	-	R-G 9	+	-	S-G 9
'Gascoigneho' 10	+	+	G 10	+	-	R-G 10	+	-	S-G 10
'Ribstonské' 1	+	+	R 1	+	o	R-R 1	-	-	S-R 1
'Ribstonské' 2	+	+	R 2	+	o	R-R 2	+	-	S-R 2
'Ribstonské' 3	+	+	R 3	+	-	R-R 3	+	-	S-R 3
'Ribstonské' 4	+	+	R 4	+	-	R-R 4	+	-	S-R 4
'Ribstonské' 5	+	+	R 5	+	o	R-R 5	+	-	S-R 5
'Ribstonské' 6	+	+	R 6	+	-	R-R 6	+	-	S-R 6
'Ribstonské' 7	+	+	R 7	+	-	R-R 7	+	-	S-R 7

Pokračování Tab 8.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátoru	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Ribstonské' 8	+	+	R 8	+	-	R-R 8	+	-	S-R 8
'Ribstonské' 9	+	+	R 9	+	-	R-R 9	+	o	S-R 9
'Ribstonské' 10	+	+	R 10	+	o	R-R 10	+	-	S-R 10
'Boskoopské' 1	+	+	B 1	+	-	R-B 1	-	-	S-B 1
'Boskoopské' 2	+	+	B 2	+	o	R-B 2	+	+	S-B 2
'Boskoopské' 3	+	+	B 3	+	o	R-B 3	+	+	S-B 3
'Boskoopské' 4	+	+	B 4	+	-	R-B 4	+	-	S-B 4
'Boskoopské' 5	+	+	B 5	+	-	R-B 5	+	-	S-B 5
'Boskoopské' 6	+	+	B 6	+	-	R-B 6	-	-	S-B 6
'Boskoopské' 7	+	+	B 7	+	+	R-B 7	+	-	S-B 7

Pokračování Tab 8.

<u>Odrůda</u>	<u>metoda 1</u>			<u>metoda 2</u>			<u>metoda 3</u>		
	Roub indikátoru	Roub testované odrůdy	Použitá zkratka	Roub indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka	Očko indikátoru	Očko testované odrůdy	Použitá zkratka
'Boskoopské' 8	+	+	B 8	+	o	R-B 8	+	-	S-B 8
'Boskoopské' 9	+	+	B 9	+	+	R-B 9	+	-	S-B 9
'Boskoopské' 10	+	+	B 10	+	o	R-B 10	+	-	S-B 10

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + očko vyrašilo, - očko nevyrašilo, o očko nepřirostlo

Tab. 9 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek PČ, metoda číslo 1).

Příznaky	Odrůda 'Panenské české' (metoda číslo 1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Podezřelá	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
zakrslý růst	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poškozená mšicemi	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 10 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek KR, metoda číslo 1).

Příznaky	Odrůda 'Kanadská reneta' (metoda číslo 1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
podezřelá	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poškozená mšicemi	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 11 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigneo' (vzorek G, metoda číslo 1).

Příznaky	Odrůda 'Gascoigneo' (metoda číslo 1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
podezřelá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
extrémně poškozená mšicemi	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
poškozená mšicemi	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016**Vysvětlivky:** + s typickými příznaky, - bez typických příznaků**Tab. 12** Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (vzorek R, metoda číslo 1).

Příznaky	Odrůda 'Ribstonské' (metoda číslo 1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
podezřelá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
poškozená mšicemi	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016**Vysvětlivky:** + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 13 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek B, metoda číslo 1).

Příznaky	Odrůda 'Boskoopské' (metoda číslo 1)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
podezřelá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
poškozená mšicemi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 14 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek R-PČ, metoda číslo 2).

Příznaky	Odrůda 'Panenské české' (metoda číslo 2)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
podezřelá	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
zakrslý růst	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
poškozená mšicemi	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 15 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek R-KR, metoda číslo 2).

Příznaky	Odrůda 'Kanadská reneta' (metoda číslo 2)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
podezřelá	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
zakrslý růst	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
poškozená mšicemi	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 16 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigne' (vzorek R-G, metoda číslo 2).

Příznaky	Odrůda 'Gascoigne' (metoda číslo 2)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
podezřelá	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
extrémně poškozená mšicemi	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
poškozená mšicemi	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 17 Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (vzorek R-R, metoda číslo 2).

Příznaky	Odrůda 'Ribstonské' (metoda číslo 2)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
podezřelá	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poškozená mšicemi	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 18 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek B-R, metoda číslo 2).

Příznaky	Odrůda 'Boskoopské' (metoda číslo 2)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
podezřelá	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
zakrslý růst	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
poškozená mšicemi	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 19 Příznaky proliferace u odrůdy 'Panenské české' (vzorek S-PČ, metoda číslo 3).

Příznaky	Odrůda 'Panenské české' (metoda číslo 3)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
podezřelá	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
zakrslý růst	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
poškozená mšicemi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 20 Příznaky proliferace u odrůdy 'Kanadská reneta' (vzorek S-KR, metoda číslo 3).

Příznaky	Odrůda 'Kanadské reneta' (metoda číslo 3)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
podezřelá	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
poškozená mšicemi	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 21 Příznaky proliferace u odrůdy 'Gascoigneo' (vzorek S-G, metoda číslo 3).

Příznaky	Odrůda 'Gascoigneo' (metoda číslo 3)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
podezřelá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
poškozená mšicemi	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 22 Příznaky proliferace u odrůdy 'Ribstonské' (S-R, metoda číslo 3).

Příznaky	Odrůda 'Ribstonské' (metoda číslo 3)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
podezřelá	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
zakrslý růst	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
extrémně poškozená mšicemi	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
poškozená mšicemi	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků

Tab. 23 Příznaky proliferace u odrůdy 'Boskoopské' (vzorek S-B, metoda číslo 3).

Příznaky	Odrůda 'Boskoopské' (metoda číslo 3)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bez příznaků	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
podezřelá	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
zakrslý růst	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
extrémně poškozená mšicemi	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
poškozená mšicemi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
zhuštěný vrchol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
chlorotizace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
uhynula	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
raší podnož	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Zdroj: archiv autora, 2016

Vysvětlivky: + s typickými příznaky, - bez typických příznaků