

Tomáš Kiss, Tomáš Nečas,
Jana Nečasová, Jan Wolf a Ivo Ondrášek

Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin skupiny 16 SrX

(*'Candidatus Phytoplasma prunorum'*,
'Candidatus Phytoplasma mali'
a *'Candidatus Phytoplasma pyri'*)

pomocí real-time PCR

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Mendelova Univerzita v Brně

Tomáš Kiss, Tomáš Nečas,
Jana Nečasová, Jan Wolf a Ivo Ondrášek

**Kvantifikace fytoplazem
ovocných dřevin skupiny 16 SrX
(*'Candidatus Phytoplasma prunorum'*,
'Candidatus Phytoplasma mali'
a *'Candidatus Phytoplasma pyri'*)
pomocí real-time PCR**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2019

Kontakty na vedoucí autorského kolektivu:

Ing. Tomáš Kiss, tomas.kiss@mendelu.cz

Ing. Tomáš Nečas, Ph.D., tomas.necas@mendelu.cz

Oponenti:

doc. Ing. Daniela Benediková, CSc. NPPC – VÚRV Piešťany

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D. Laboratoř biochemie,

Odbor diagnostiky, ÚKZÚZ

Fotografie na obálce:

Assoc. Prof. Assunta Bertaccini

Certifikovaná metodika „Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin skupiny 16 SrX (*Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma mali* a *Candidatus Phytoplasma pyri*) pomocí real-time PCR“ vznikla za finanční podpory MZe, NAZV/KUS, projektu QJ1510352 „Hodnocení faktorů ovlivňujících škodlivost fytoplazem napadajících ovocné dřeviny a ověřování účinných prostředků jejich eliminace.“ Publikaci bylo uděleno osvědčení číslo ÚKZÚZ 007034/2019 v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

© Mendelova Univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7509-632-6

OBSAH

1 Cíl metodiky – úvod	5
2 Vlastní popis metodiky	7
2.1 Historie objevu fytoplazem	7
2.2 Charakteristika fytoplazem	11
2.3 Translokace fytoplazem uvnitř rostliny	12
2.4 Vektory a přenos fytoplazem	13
2.5 Popis fytoplazem ze skupiny 16 SrX	15
2.5.1 ‘ <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum’ evropská žloutenka peckovin (ESFY)	15
2.5.2 ‘ <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali’ proliferace jabloně (AP)	22
2.5.3 ‘ <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri’ chřadnutí hrušně (PD)	26
2.6 Detekce fytoplazem ze skupiny 16 SrX	31
2.6.1 Popis metody real-time PCR	32
2.7 Výsledky experimentů	37
2.7.1 Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin ze skupiny 16 SrX pomocí real-time PCR	37
3 Srovnání novosti postupů	55
4 Popis uplatnění certifikované metodiky	57
5 Ekonomické aspekty	59
6 Seznam použité související literatury	61
7 Seznam publikací, které předcházely metodice	79

1 CÍL METODIKY – ÚVOD

Problematika výskytu fytoplazem na našem území je známá od 50. až 60. let minulého století. V té době bylo často popisováno onemocnění bez prokazatelně potvrzeného původce způsobující předčasné odumírání meruněk a často spojované s apoplexií. V počátku se tyto choroby řadily mezi viry a později k mykoplazmám (MLO) a až posléze byla prokázána nová skupina patogenů nazvaná jako fytoplazmy.

V současné době dosahují ekonomické ztráty v produkčních výsadbách a množitelských porostech ovocných druhů způsobené fytoplazmami nezanedbatelných milionových hodnot, a to v celém Evropském společenství. Jednotlivé fytoplazmy atakují hostitelské ovocné druhy v různých regionech proměnlivě. Například ‘*Ca. Phytoplasma prunorum*’ (fytoplazma evropské žloutenky peckovin) významně ovlivňuje pěstování meruněk ve Francii, Itálii, Španělsku a samozřejmě i v ČR. ‘*Ca. Phytoplasma pyri*’ (fytoplazma chřadnutí hrušně) je kriticky rozšířená v Německu. ‘*Ca. Phytoplasma mali*’ (fytoplazma proliferace jabloně) známá jako proliferace jabloně postihuje všechny významné regiony s produkcí jablek.

Pro naše podmínky jsou největším infekčním zdrojem fytoplazem země jižní Evropy, odkud se dováží nejvíce výsadbového a školkařského materiálu. Výzkum ze sousedních zemí (Maďarsko, Rakousko, Slovensko, Itálie) prokázal, že se u nich ve výsadbách peckovin nevyskytují pouze evropské autochtonní fytoplazmy (‘*Ca. P. prunorum*’), ale také některé typy z USA nebo Dálného východu (např. *Little peach*, *Peach rosette*, *Peach western x – disease*, *California peach yellow leaf roll*), což znamená, že je jen otázkou času, kdy se objeví i ve výsadbách u nás. Tyto pro evropské poměry cizí fytoplazmy byly nalezeny především ve šlechtitelských a genofondových výsadbách.

Přenos fytoplazem je dnes již dostatečně objasněn. Jedná se o přirozený přenos merami a křísy a dále o umělé šíření některými vegetativními způsoby rozmnožování.

Fytoplazmy je možné detekovat molekulárně genetickými metodami PCR (nested) a následně určit metodou RFLP. Pro orientační detekci lze použít fluorescenční mikroskopii (DAPI). Pro detekci AP

byla používána séra uplatnitelná v metodě ELISA (podobný princip jako detekce virů). Detekčním standardem se dnes stává metoda real-time PCR. Z novějších metod se začíná využívat metody LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) a případně její modifikace Blue LAMP. Obě tyto metody ale mají doposud nedořešenou přesnost právě u fytoplazem ze skupiny proliferace jabloně.

Ochrana vůči fytoplazmám spočívá zejména v zamezení šíření hmyzích vektorů, dodržování certifikačního schématu při dopěstování sadby ovocných dřevin s použitím VF (virus free) a VT (virus tested) rozmnožovacího materiálu a rezistentních odrůd (případně tolerantních) a zejména v cíleném hledání tolerantních, případně odolných genotypů.

Cílem metodiky je definovat jednotný, funkční a opakovatelný postup kvantifikace fytoplazmatického obsahu v pletivech ovocných dřevin. Důvodem jsou právě výše uvedené skutečnosti spojené s nedostatkem odolných odrůd a vysokou proinfikovaností produkčních sadů a matečných roubových i semenných porostů.

Hlavní využití této metodiky je cíleno na postupy šlechtění odolných genotypů a fenotypizaci potenciálně tolerantních/odolných potomstev (jedinců), případně přirozených zdrojů rezistence (publikačně prokázány pouze v případě 'Ca. P. mali'), existují-li i u ostatních ovocných druhů. Kvantifikace v pletivech pomůže při studiu interakcí fytoplazmy a hostitele, při hodnocení odolnosti či tolerance.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Historie objevu fytoplazem

První onemocnění fytoplazmou bylo popsáno zhruba před jedním tisícem let v Číně během dynastie Song, 960–1227, kde pivoňky nazývané jako "Yao-yellow kind" byly oslavovány jako nejkrásnější pivoňkové keře a byly každoročně předkládány na císařský dvůr. Světle zelená barva květů byla vysoce ceněna v Číně po celá staletí, ačkoli pivoňka měla zakrnělý vzrůst a z květů nevznikaly plody se semeny. Trvalo více než 800 let, než mohlo být prokázáno, že příčinou tohoto nestandardního vzrůstu a barvy květů pivoněk je onemocnění způsobené fytoplazmami. Odrůdy pivoněk podobného typu se v Číně pěstovaly ještě v 70. letech 20. století (MARAMOROSCH *et al.*, 1988, 2011).

Další písemná zmínka o nemoci pravděpodobně způsobené fytoplazmami, označované jako zakrslost morušovníku s projevem neurčitého onemocnění, byla poprvé popsána a pozorována v Japonsku v období vlády tzv. šógunátu Tokugawa (tzv. období Edo – 江戸時代 / Tokugawa shogunate) v letech 1603–1868, kdy se tato nemoc široce rozšířila a působila závažné škody na morušových plantážích (OKUDA, 1972).

Další historické zmínky uvádí případy výskytu metlovitosti pavlovnice, žloutenky a žluté zakrslosti rýže, které byly zaznamenány již okolo roku 1900 (KUNKEL, 1926; LEE *et al.*, 2000; OKUDA, 1972).

Fytoplazmy jako patogenní organismy přežívající ve floému rostlin byly v novodobé historii poprvé identifikovány a popsány v roce 1967 (DOI *et al.*, 1967) pomocí elektronové mikroskopie, a to u preparátů odebraných ze stromů moruší postižených právě zakrslostí. Současně byly stejné organismy potvrzeny u preparátů připravených z lýka rostliny bramboru a pavlovnice postižených metlovitostí a dále u petúnie postižené žloutenkou aster. Protože morfologie těchto organismů vyskytujících se v sítkovicích lýka a občas i v parenchymu lýka byla podobná organismům ze skupiny živočišných patogenů z třídy *Mollicutes* (bakterie bez buněčné stěny) nazývané mykoplazmy, byly nazvány „mycoplasma-like organism“, ve zkratce MLOs (DOI *et al.*, 1967). Shodou okolností byly mykoplazmy

pozorovány ve veterinární laboratoři na stejné fakultě a také pomocí elektronového mikroskopu, ale o několik let dříve (IIDA, 1972). Následně bylo k MLOs přiřazeno mnoho nově objevených chorob s podobnými příznaky včetně spiroplazmóz. V roce 1990 byla fylogenetickou analýzou sekvencí DNA získaných z těchto organismů prokázána existence velké monofyletické skupiny uvnitř třídy *Mollicutes*, přičemž k jejich označování byl navržen triviální název fytoplazmy. V roce 1994 bylo pracovní skupinou pro fytoplazmy na 10. kongresu Mezinárodní organizace pro mykoplazmózy (IOM – International Organization of Mycoplasmaology) přijato ke kolektivnímu označování MLOs označení „phytoplasma“ (McCOY *et al.*, 1989; LEE a DAVIS 1992; HOGENHOUT *et al.*, 2008; DICKINSON *et al.*, 2013; BERTACCINI *et al.*, 2014).

Další organismy zahrnuté do třídy *Mollicutes* jsou mykoplazmy, acholeplazmy a spiroplazmy a jim blízké příbuzné bakterie jako *Bacillus*, *Clostridium* a *Streptococcus*. WOESE *et al.* (1980) naznačili, že rody jako *Mycoplasma*, *Spiroplasma* a *Acholeplasma* pochází z jediné linie odvozené z grampozitivních bakterií (WOESE, 1987), což bylo potvrzeno v několika dalších studiích (WEISBURG *et al.*, 1989). V roce 1989 byla sekvence genu 16S rRNA pocházející z MLOs (*Oenothera virescens* phytoplasma) patřící do skupiny žloutenky aster srovnána s *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri* a několika mykoplazmami (LIM a SEARS, 1989). Na základě této analýzy bylo navrženo zařazení fytopatogenních MLO do třídy *Mollicutes* a také bylo prokázáno, že MLO jsou více příbuzné rodu *Acholeplasma* než rodu *Spiroplasma* nebo evolučně vzdáleným živočišným mykoplazmám. Tyto výsledky byly potvrzeny také pomocí analýzy několika ribozomálních proteinových sekvencí a sekvencí genu 16S rRNA (LIM a SEARS, 1991, 1992; KUSKE a KIRKPATRICK, 1992; NAMBA *et al.*, 1993 a, b; SEEMÜLLER *et al.*, 1994; TOTH *et al.*, 1994). Fylogenetické analýzy založené na různých konzervativních genech prokázaly, že MLO představují průkaznou a zřetelnou monofyletickou skupinu v rámci třídy *Mollicutes*.

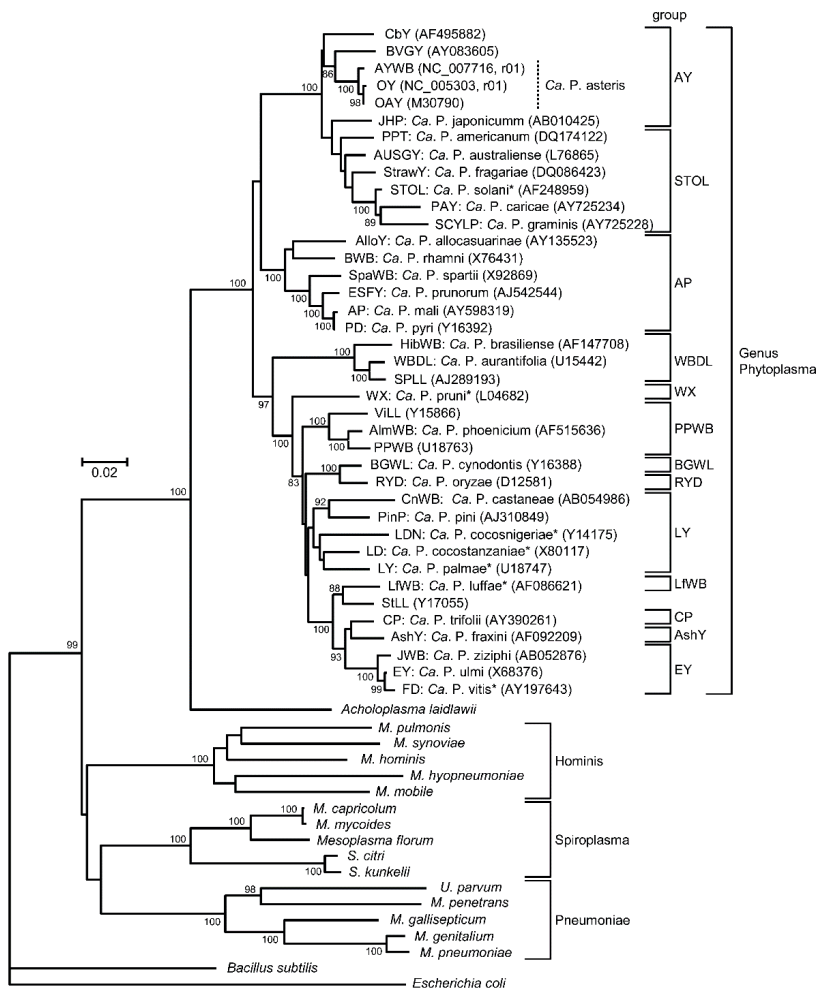
V současné době je v databázi GenBank uloženo více než 1 000 sekvencí, na jejichž základě bylo navrženo, aby byly fytoplazmy zařazeny do nového rodu '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*' (IRPCM, 2004). Právě s pomocí sekvence oligonukleotidů unikátního regionu

16S rRNA CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT byly fytoplazmy definovány jako patogen ‘*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*’. Kmen může být v podstatě popsán jako nový druh ‘*Ca. Phytoplasma*’ (species), jestliže má jeho 16S rRNA sekvence genu menší podobnost (< 97,5 %) než sekvence jakéhokoliv dříve popsaného druhu ‘*Ca. Phytoplasma*’. Od té doby až doposud bylo formálně popsáno 35 ‘*Ca. Phytoplasma species*’ (ARROCHA *et al.*, 2005; DAVIS *et al.*, 1997; GRIFFITHS *et al.*, 1999; HIRUKI a WANG 2004; IRPCM, 2004; JUNG *et al.*, 2002, 2003; LEE *et al.*, 2004a, b, 2006; MARCONE *et al.*, 2004a, b; MONTANO *et al.*, 2001; SAWAYANAGI *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 2005; SEEMÜLLER a SCHNEIDER 2004; VALIUNAS *et al.*, 2006; VERDIN *et al.*, 2003; ZREIK *et al.*, 1995). Dále byl uznán popis u některých dalších fytoplazem, jako např. ‘*Ca. P. vitis*’, ‘*Ca. P. palmae*’, ‘*Ca. P. luffae*’, ‘*Ca. P. cocostanziana*’, ‘*Ca. P. cocosnigeriae*’ (IPRCM, 2004).

Přestože existuje více než 1 000 16S rRNA genových sekvencí fytoplazem archivovaných v databázi GenBank je zřejmé, že další konzervativnější sekvenční DNA markery by měly být používány jednak pro lepší rozlišení a také k identifikaci kmenů fytoplazem, pakliže mají být nalezeny rozdíly v patogenitě, ve vztazích k vektorům a citlivosti k hostitelům. Konkrétní genové sekvence ribosomálního proteinu mohou odhalit více variací než 16S rDNA a analýzy provedené pomocí RFLP nebo sekvencováním tuč případně SecY genů ukazují také zřetelné náznaky kmenů fytoplazem propojené s jejich geografickým původem (SCHNEIDER *et al.*, 1997; MARCONE *et al.*, 1999, 2000; MARTINI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012; MITROVIĆ *et al.*, 2011), přičemž se také používají pro epidemiologické studie s cílem vypracovat strategii managementu a kontroly nad hlavními chorobami způsobenými fytoplazmami.

Kompletní sekvenace genomu byla zatím dokončena u dvou kmenů fytoplazmy žloutenky astry (‘*Ca. P. asteris*’), dále dvou kmenů ‘*Ca. P. australiense*’ a kmene proliferace jabloně ‘*Ca. P. mali*’. (ANDERSEN *et al.*, 2013; BAI *et al.*, 2006; KUBE *et al.*, 2008; OSHIMA *et al.*, 2004; TRAN-NGUYEN *et al.*, 2008). Výzkum fytoplazem za období téměř 50 let pokročil tak daleko, že v současné době je popisováno až 1 000 onemocnění způsobených fytoplazmami po celém světě (MARAMOROSCH, 2011).

Obr. 1 HOGENHOUT *et al.*, 2008: Fylogenetické schéma



Fylogenetické schéma bylo konstruováno metodou neighbour joining (SAITOU a NEI, 1987) s použitím 16S rRNA sekvence genu získaného z fytoplazem, acholeplazem, mykoplazem, spiroplazem, z *Mesoplasma florum*, *Ureaplasma parvum*, *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Fytoplazmy jsou zařazeny do jednoho shluku, který je izolovaný od *Acholeplasma* spp. Čísla na větvích jsou hodnoty

Bootstrap (zobrazeny jsou pouze hodnoty > 80 %). Evidenční čísla GenBank jsou uvedena v závorkách. Hvězdičky označují navrhovaná prozatímní jména (IRPCM, 2004). Zkratky: AlloY, allocasuarina yellows; AlmWB, Almond witches' broom; AP, apple proliferation; AshY, ash yellows; AUSGY, Australian grapevine yellows; AY, aster yellows; AY-WB, aster yellows phytoplasma strain witches' broom; BGWL, Bermuda grass white leaf; BVGY, Buckland valley grapevine yellows; BWB, buckthorn witches' broom; Ca. P., *Candidatus* Phytoplasma; ChY, Chinaberry yellows; CnWB, chestnut witches' broom; CP, clover proliferation; ESFY, European stone fruit yellows; EY, elm yellows; FD, flavescence dorée of grapevine; HibWB, Hibiscus witches' broom; JHP, Japanese Hydrangea phyllody; JWB, jujube witches' broom; LD, coconut lethal yellowing; LDN, coconut lethal yellowing; LY, coconut lethal yellowing; LfWB, loofah witches' broom; M., Mycoplasma; OY, onion yellows; PAY, papaya; PD, pear decline; PPT, potato purple top wilt; PPWB, Caribbean pigeon pea witches' broom; RYD, rice yellow dwarf; S., Spiroplasma; SCYLP, sugarcane yellow leaf syndrome; SpaWB, spartium witches' broom; SPLL, sweet potato little leaf; STOL, stolbur; StrawY, strawberry yellows; ViLL, Vigna little leaf; WBDL, witches' broom disease of lime; WX, western X-disease.

2.2 Charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou nehelikální prokaryontní rostlinné patogeny, které mohou způsobovat významné ztráty výnosu u různých hospodářsky významných plodin po celém světě (LEE *et al.*, 2000; BERTACCINI, 2007). Jsou řazeny mezi obligátní endofyty rostlin a hmyzu a ve většině případů potřebují oba hostitele pro vlastní rozšiřování v přírodě. V rostlinách zůstávají většinou lokalizovány ve floému (DOI *et al.*, 1967; WHITCOMB a TULLY, 1989) a dále se rozšiřují po celé rostlině průchodem přes sítko (cribrum) sítkovického parenchymu, který odděluje sítkovice floému.

Fytoplazmy patří mezi tzv. pleomorfní bakterie o velikosti od 200 do 800 nm, průměrně pak okolo 500 nm. Pleomorfní jsou kvůli absenci buněčné stěny, nicméně mají jednotkovou buněčnou membránu, cytoplazmu, ribozomy, chromozomy a kruhové plazmidy, DNA i RNA. V ultratenkých řezech je možné je identifikovat jako komplex silně rozvětvených vroubkovaných vláken nebo jako kulovitě

polymorfní částice (FLORENCE a CAMERON, 1978; WATERS a HUNT, 1980; CHRISTENSEN *et al.*, 2005). Fytoplazmy mají velmi malé genomy o velikosti od 530 do 1 350 kb (průměrně 750 kb) a nízký obsah G+C bází ve své DNA, okolo 23,0–29,5 Mol % (GUNDERSEN *et al.*, 1996; MARCONE *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2000; OSHIMA *et al.*, 2004; FIRRAO *et al.*, 2005; BAI *et al.*, 2006). Konkrétní nukleotidy, které jsou charakteristické pro ‘*Ca. Phytoplasma*’ jsou: A v pozici 242, T v pozici 286 a T v pozici 1247 (v sekvenci GenBank přístupové č. M30790). Vedle genomického segmentu 16S rDNA – mezigenový mezerník (intergenic spacer, IGS) – 23S rDNA, jsou analyzovány i geny pro ribozomální proteiny (rp) a tuf gen (IRPCM, 2004). Oligonukleotidy, které jsou specifické pro ‘*Ca. Phytoplasma*’ na 16S rRNA genu byly publikovány v pracích mnoha autorů např: DENG a HIRUKI, 1991; AHRENS a SEEMÜLLER, 1992; FIRRAO *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1993b; NAMBA *et al.*, 1993b; SCHNEIDER *et al.*, 1993; PADOVAN *et al.*, 1995; GUNDERSEN a LEE, 1996. Všechny kmeny ‘*Ca. Phytoplasma*’, které byly doposud zkoumány, mají dva rRNA operony (SEEMÜLLER *et al.*, 1994; FIRRAO *et al.*, 1996b; LAUER a SEEMÜLLER, 2000; PADOVAN *et al.*, 2000; MARCONE a SEEMÜLLER, 2001) a obvykle jeden tRNA-*Ile* v oblasti mezigenového mezerníku mezi geny 16S a 23S rRNA (KUSKE a KIRKPATRICK, 1992; SMART *et al.*, 1996). Heterogenita obou operonů je zřejmá u některých fytoplazem (LEE *et al.*, 1993a; FIRRAO *et al.*, 1996a; LIEFTING *et al.*, 1996; DAVIS a SINCLAIR, 1998; JOMANTIENE *et al.*, 2002). Fytoplazmy se svým minimálním genomem patří k nejjednodušším známým přirozeně samorozmnožujícím se formám života, na hranici mezi živými buněčnými organismy a viry (CHRISTENSEN *et al.*, 2005).

2.3 Translokace fytoplazem uvnitř rostliny

Fytoplazmy se přenášejí slinami hmyzích vektorů do penetrovatelných buněk floému, ze kterých se v rostlině šíří systémově pomocí kontinuálního systému sítkovic. Fytoplazmy jsou pleomorfní a dostatečně malé, tak aby mohly volně projít sítkovicemi, takže by mohly být jen unášeny spolu s asimilačním tokem z listů do rostlinných orgánů zpracovávajících cukr, podobně jako u virů. V souladu s tím bylo experimentálně zjištěno, že fytoplazmy byly obsaženy

ve vodivých pletivech orgánů, jako jsou nezralé listy a kořeny, přičemž zdrojové listy zůstaly neinfikované (SIDDIQUE *et al.*, 1998). Naproti tomu byl potvrzen vysoký titr u zdrojových listů a nízká kolonizace u vodivých pletiv (KAMINSKA *et al.*, 2003; CHRISTENSEN *et al.*, 2004, NEČASOVÁ *et al.*, 2016). Studie zaměřené na translokaci fytoplazem po lokalizované inokulaci (WEI *et al.*, 2004) nebo rekolonizaci stromů (GARCIA-CHAPA *et al.*, 2003), dokládají, že translokaci fytoplazem uvnitř rostliny nelze vysvětlit pouze asimilačním tokem, ačkoliv aktivní pohyb fytoplazem vypadá nepravděpodobně i s ohledem na nedostatek genů kódujících prvky cytoskeletu nebo bičíky. Vzhledem k tomu, že u fytoplazem bylo prokázáno, že se přidrží hostitelských buněk (LEFOL *et al.*, 1993), stejně jako je tomu u jiných *Mollicutes* (RAZIN *et al.*, 1998; BERG *et al.*, 2001), fytoplazmy se mohou přidržovat a růst podél buněčné membrány sítkovic i proti asimilačnímu toku (CHRISTENSEN *et al.*, 2005).

Pro urychlení výzkumu fytoplazem by možnost jejich kultivace na médiu byla vysoce přínosná. I v případě výzkumu mykoplazmóz byly kompletně sekvencovány pouze genomy kultivovatelných druhů. Nicméně v letech 2004 a 2006 byly publikovány genomy dvou fytoplazem (OSHIMA *et al.*, 2004; BAI *et al.*, 2006). Tyto genomové sekvence přinesly nové poznatky, které by mohly vést k významnému rozvoji kultivačních médií a diagnostických testů pro fytoplazmy.

Fytoplazmy jsou obecně vnímavé k antibiotikům tetracyklinové řady, ale ne k penicilinu (ISHIE *et al.*, 1967). Dále jsou membrány fytoplazem rezistentní k digitoninu, ale silně vnímavé k hypotonickému prostředí (LIM *et al.*, 1992).

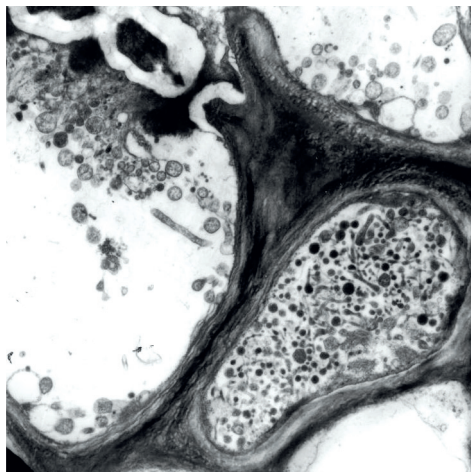
2.4 Vektory a přenos fytoplazem

V obecné rovině je přenos fytoplazem možný dvojím způsobem, kdy jeden je zcela přirozeným způsobem šíření těchto organismů vzniklým v průběhu evoluce a druhý vznikl jako důsledek lidské činnosti. Přirozeně se fytoplazmy šíří pomocí hmyzích vektorů, jako jsou křísoci, svítilky a mery, a také kokotici (*Cuscuta* spp.), rostlinným parazitem z čeledi *Convolvulaceae* (MARCONE *et al.*, 1997; PŘIBYLOVÁ a ŠPAK, 2013). Člověk pak působí na šíření fytoplazem vegetativními způsoby množení pěstovaných rostlin, zahrnujícími jak přímé, tak

nepřímé způsoby množení. Mezi hlavní způsoby šíření fytoplazem vegetativním rozmnožováním patří štěpování, řízkování a *in-vitro* kultury. Dále mohou být šířeny infikovanými dceřinými hlízkami, cibulemi, oddenky a také dělením trsů (trvalky). Fytoplazmy nelze přenášet z rostliny na rostlinu rostlinnou mízou ani nářadím, jako je tomu u rostlinných virů (WHITCOMB a TULLY, 1989).

V souvislosti s hmyzími vektory existují teorie, které naznačují, že fytopatogenní *Mollicutes* mohly vzniknout z organismů žijících v hmyzím organismu. Při sání hmyzu na rostlinách mohly být bakterie *Mollicutes* přeneseny do rostlinných pletiv, uvnitř kterých se vyvinuly v parazity (HACKETT *et al.*, 1989). Samozřejmě nefytopatogenní a nekultivovatelné MLO, které by mohly být spojené s fytopatogenními *Mollicutes*, byly pozorovány u několika hmyzích řádů, které se živí sáním rostlinných tekutin (KIRKPATRICK, 1992).

Obr. 2 Obraz průřezu buněk sítkovic s fytoplazmami (elektronový mikroskop, zvětšení 6000x (BERTACCINI, A., 2014).



2.5 Popis fytoplazem ze skupiny 16 SrX

2.5.1 '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' – fytoplazma evropské žloutenky peckovin (ESFY)

Fytoplazma evropské žloutenky peckovin (ESFY – European stone fruit yellows phytoplasma) (synonyma: phytoplasma prunorum, apricot chlorotic leafroll phytoplasma (ACLR), decline of Japanese plum, dieback of apricot, European yellows of peach, plum leptonecrosis apod.)

Předčasné odumírání postihující japonské slivoně a meruňky bylo popsáno na začátku 20. století v sadech, které se nacházely napříč jižní částí Francie a Itálie. Odumírání spojené s apoplexií u meruňek bylo poprvé popsáno CHABROLINEM (1924). Toto onemocnění několika druhů peckovin bylo později označeno jako „Apricot chlorotic leaf roll“ (ACLR – chlorotická svinutka listů meruňek). „Peach yellows“, „Plum leptonecrosis“ (PLN) nebo „Plum decline“ byly původně pokládány za virové choroby, neboť se přenášely štěpováním (USDA, 2012).

Protože LORENZ *et al.* (1994), SEEMÜLLER a FOSTER (1995) a MARCONE *et al.* (1996) dospěli k závěru, že mnohé onemocnění rodu *Prunus* v Evropě, popsané pod různými názvy, např. apricot chlorotic leafroll, cherry Molières disease, Japanese plum decline, nectarine chlorotic leaf roll, peach decline, peach rosette (objevená v Itálii, MARCONE a RAGOZZINE, 1994), peach vein clearing, peach vein enlargement, peach yellows (European), plum leptonecrosis (poprvé zaznamenána v Itálii na japonských slivoních (*Prunus salicina*) GOIDANICHEM v roce 1933) a další nemoci postihující mandloně a kvetoucí třešně (*P. serrulata*), jsou způsobeny stejnou fytoplazmou (nebo geneticky velmi podobnými fytoplazmami), bylo proto navrženo sjednocující označení European stone fruit yellows phytoplasma (Fytoplazma evropské žloutenky peckovin). V rámci studia tohoto onemocnění bylo pozorováno několik kmenů, které se liší virulencí, specificitou hostitele a schopností indukovat růst mimo vegetační sezónu. ESFY je úzce příbuzná s fytoplazmou proliferace jabloně (EPPO / CABI, 1996a), s fytoplazmou chřadnutí hrušňi (EPPO / CABI, 1996b) a dále s několika málo dalšími fytoplazmami ze skupiny proliferace

jabloně (AHRENS *et al.*, 1993; LORENZ *et al.*, 1994; SEEMÜLLER *et al.*, 1994). Nicméně se liší od některých fytoplazem pocházejících z evropských peckovin a také se liší od fytoplazmy označované jako peach X-disease (syn. Western X-disease), která je hlavním patogenem v Severní Americe, ale nevyskytuje se v Evropě (AHRENS *et al.*, 1993; LORENZ *et al.*, 1994; SEEMÜLLER *et al.*, 1994).

Někteří autoři tvrdí, že i u ESFY lze rozlišit různé kmeny fytoplazmy. Jsou to například GENTIT *et al.* (1998), kteří zjistili na společném indikátoru (GF 305) na jedné straně zřetelné symptomy ACLR a na druhé straně peach vein clearing a Japanese plum decline (a také fytoplazmy peach yellows a peach yellow leaf roll). LEE *et al.* (1995) zjistili, že kmeny fytoplazmy spojené s onemocněním nectarine chlorotic leaf roll patří do skupiny žloutenky astry. V roce 2004 bylo navrženo zařadit fytoplazmy v rámci nového rodu *Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma* a samotnou fytoplazmu evropské žloutenky peckovin (ESFY) jako '*Candidatus* *Phytoplasma prunorum*' (SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004).

Fytoplazma evropské žloutenky peckovin, je doposud jediný potvrzený patogen způsobující fytoplazmózní onemocnění u rodu *Prunus* v Evropě, který může přetrvávat v nadzemních částech stromu v celém vegetačním období a současně celoročně v kořenovém systému stromu (SEEMÜLLER *et al.*, 1998b; JARAUSCH *et al.*, 1999a). Monitorování populace fytoplazmy fluorescenční mikroskopickou metodou DAPI a metodou PCR ukázalo, že patogen v jarním období pomalu kolonizuje listy, což odpovídá kolonizačnímu schématu shodnému s fytoplazmami '*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*'. Systémová kolonizace infikovaných stromů probíhá od července až do pozdního podzimu. U vnímavých genotypů specifické příznaky vysoce korelují s přítomností patogenu (JARAUSCH *et al.*, 1999b). '*Ca. P. prunorum*' je etiologickým původcem ESFY a je považován za nejdůležitější patogen způsobující předčasný úhyn stromů pěstovaných druhů rodu *Prunus*.

Analýza nukleotidové sekvence 16S rDNA odhalila rozdíly, které se pohybují v rozmezí 1,0 až 1,5 %, což je pod hranicí 2,5 % potřebných pro zařazení jako samostatného druhu. Nicméně rozlišení druhů '*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*' bylo provedeno na základě jiných molekulárních markerů, a to oblasti 16S-23S rRNA

a ribozomálního proteinu, dále na základě sérologického srovnání (založené na identifikaci imp, imunodominantního membránového proteinu), identifikaci vektorového přenosu a hostitelských druhů (LOI *et al.*, 2002; SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004). Tyto fytoplazmy jsou také charakterizovány tím, že jejich genomy jsou organizovány do lineárního chromozomu, což je výjimečné mezi fytoplazmami i mezi bakteriemi. Molekulární studie za použití hybridizace southern blot, RFLP a sekvence PCR produktů amplifikace ribozomální a neribozomální DNA ukázala, že '*Ca. P. prunorum*' je poměrně homogenním organismem v celé Evropě (AHRENS *et al.*, 1993; LORENZ *et al.*, 1994; KISON *et al.*, 1997; JARAUSCH *et al.*, 1998, 2000a; SEEMÜLLER *et al.*, 1998b; SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004). V mezidruhových srovnáních ESFY/AP, ESFY/PD, ESFY/PYLR a agentic ESFY/PDTW byly rozdíly v 16S sekvencích rDNA 1,3–1,5; 1,2–1,3; 1,4–1,6 a 1,2–1,4 % (SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004; LIU *et al.*, 2007). Daleko vzdálenější '*Ca. P. prunorum*' jsou čtyři další fytoplazmy ze stejné skupiny proliferace jabloně: '*Ca. P. spartii*' (čarověník/metlovitost vítečníku), '*Ca. P. rhamnii*' (čarověník/metlovitost rakytníku), '*Ca. P. allocasuarinae*' (žloutenka allocasuariny) a '*Ca. P. tamaricis*' (salt cedar witches' broom). Tyto fytoplazmy rozděluje 94% a 97,1% sekvenční podobnost 16S rDNA s '*Ca. P. prunorum*' (MARCONE *et al.*, 2004ab; ZHAO *et al.*, 2009). '*Ca. P. prunorum*' se liší v 16/23S rDNA mezigenovém mezerníku (region mezi geny 16S a 23S rDNA) v sekvenci nukleotidů od 1,3 % do 3 % od ostatních fytoplazem napadajících ovocné dřeviny ze skupiny AP ('*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*') a více než 11 % od ostatních fytoplazem ze skupiny AP (MARCONE *et al.*, 2004ab; SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004; LIU *et al.*, 2007).

'*Ca. P. prunorum*' indukuje příznaky především na listech a letorostech (výhonech), které se mohou lišit v závislosti na druhu hostitele, podnoži, odrůdě, virulenci kmenů fytoplazmy, koncentraci fytoplazmy, klimatických podmínkách, stáří stromů a populaci hmyzího vektoru (SEEMÜLLER a FOSTER, 1995; KISON a SEEMÜLLER, 2001; THÉBAUD *et al.*, 2006).

Mezi nejtypičtější příznaky, které lze pozorovat u většiny infikovaných jedinců druhů *Prunus* patří růst mimo sezónu (na konci a před začátkem vegetačního období) a předčasné rašení listových pupenů před květem. V létě je nejběžnějším příznakem žloutnutí

listů nebo červenaní listů v kombinaci se svinutkou listů (LEDERER a SEEMÜLLER, 1992; SEEMÜLLER a FOSTER, 1995; LAIMER a BERTACCINI, 2008; JARAUSH *et al.*, 1998, 2008). Jedním z hlavních aspektů infekce ‘*Ca. P. prunorum*’ je vysoká míra úmrtnosti stromů meruněk, japonských slivoní a broskvoní zejména na citlivých podnožích. Většinou meruňkové stromy uhynou 12 až 24 měsíců po prvním výskytu symptomů. Tato doba může být významně zkrácena na období týdnů, je-li jako podnož použita broskvoň. Dokonce tolerantní druhy, jakým je evropská švestka, která také může uhynout po silných zimních mrazech, zejména je-li naočkována na citlivé podnoži. Typické příznaky ESFY jsou běžné v jižních evropských regionech, ale v současné době byly pozorovány i v Německu (JARAUSCH *et al.*, 2008).

Hostitelský okruh rostlin ‘*Ca. P. prunorum*’ zahrnuje přednostně dřeviny rodu *Prunus*. V přírodních podmínkách se vyskytuje zejména na *Prunus armeniaca* L., *P. salicina* Lindley a *P. persica* (L.) Batsch. Nicméně patogen je také běžný na mandloních (*P. dulcis* (Mill.) D. A. Webb, syn. *P. amygdalus*) a okrasných třešních, sakurách (*Prunus serrulata* Lindl.) (SEEMÜLLER *et al.*, 1998b). V přírodě (v okolí ovocných sadů) uvádí CARRARO *et al.* (2002) jako časté hostitelské rostliny (jak pro vektor *Cacopsylla pruni*, tak i pro původce onemocnění ‘*Ca. P. prunorum*’) *Prunus cerasifera* Ehrh., *Prunus domestica* L. a *Prunus spinosa* L., jež jsou nezbytné pro uzavření epidemiologického cyklu bez ohledu na kultivované stromy v sadu. Díky těmto divoce rostoucím druhům může fytoplasma přežívat v přírodě nezávisle na citlivých kulturních rostlinách (CARRARO *et al.*, 2002; JARAUSCH *et al.*, 2007).

Obr. 3 Vlevo jeden z typických symptomů fytoplazmy ESFY „svinutka listů“ na bázi letorostů.

Obr. 4 Vpravo typická intenzivní „chlorotická svinutka listů“.



Obr. 5 Vliv fytoplazmy ESFY na dozrávání plodů u odrůdy ‘Arzami aromatnyj’, vlevo plody z infikovaného stromu fytoplazmou, vpravo ze zdravého stromu sklizené ve stejném termínu (21. 7. 2006).



Obr. 6 Vlevo, na obrázku dole, typický symptom fytoplazmy ESFY „růstová deprese“ v porovnání se zdravým letorostem.

Obr. 7 Vpravo předčasné vybarvování listů infikovaných stromů.



Obr. 8 Chlorotická svinutka listů jako projev ESFY na broskvoni (letorost vpravo).

Obr. 9 Předčasné vybarvování (červenání) broskvoní uměle infikovaných fytoplazmou ESFY v nádobovém pokusu.



Obr. 10 Vliv fytoplazmy na kvalitu plodů u odrůdy 'Veselka' – vlevo nedozrálé, špatně vybarvené plody z infikovaného stromu, vpravo plody ze zdravého stromu sklizené ve stejném termínu (19. 7. 2004).



Obr. 11 Vlevo nedostatečně lignifikované pecky meruněk z infikovaných stromů fytoplazmou ESFY, vpravo pecky z plodů ze zdravých stromů meruněk.



2.5.2 '*Candidatus Phytoplasma mali*' – fytoplazma proliferace jabloně (AP)

Proliferace jabloně (synonyma: apple proliferation phytoplasma (AP), phytoplasma mali, apple witches' broom phytoplasma) byla poprvé popsána v Itálii v roce 1950 (RUI *et al.*, 1950). Od tohoto roku byla přítomnost této choroby hlášena postupně ze všech zemí střední a jižní Evropy (LORENZ *et al.*, 1995). V roce 2005 bylo v Itálii (Trentino) zjištěno, že až 65 % stromů jabloní je infikovaných fytoplazmou, a to zejména ve výsadbách starších než 25 let. Na našem území pochází první údaje o výskytu této choroby z 60. let (BLATTNÝ a BLATTNÝ, 1960) a k významnému šíření docházelo zejména v 70. letech výsadbovým materiálem. Od 90. let dochází v mnoha zemích k opětovnému šíření choroby. Na území ČR je v posledních letech rovněž pozorován zvýšený výskyt, ve větší míře zejména ve starších, zanedbaných výsadbách, které jsou však dlouhodobým zdrojem infekce a odkud se infekce šíří také do produkčních výsadeb (FIALOVÁ *et al.*, 2003; ORSÁGOVÁ 2011).

První identifikace a specifická detekce kauzálního patogenu proliferace jako '*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca. P. mali*') byla získána hybridizací dot blot za použití klonovaného fragmentu jeho chromozomální DNA (BONNET *et al.*, 1990). Vývoj specifických primerů založených na 16S rDNA a na neribozomálních sekvencích '*Ca. P. mali*' ve spojení s analýzou polymorfismu délky restrikcí fragmentů (RFLP) PCR produktů ukázaly, že s tímto onemocněním je spojeno několik geneticky mírně odlišných fytoplazem (SCHNEIDER *et al.*, 1993; KISON *et al.*, 1994; JARAUSCH *et al.*, 1994a). Navíc analýza velikosti chromozomů několika fytoplazem ukázala, že dva izoláty '*Ca. P. mali*' měly velikost genomu asi 600 kb (AT z Německa) a 690 kb (AP15 z Itálie). Pro srovnání, '*Ca. P. prunorum*' má velikost 630 kb a '*Ca. P. pyri*' má velikost 660 kb. Pro '*Ca. P. mali*' byla na pozici 1393–1409 detekována charakteristická typová sekvence 5'-AATACTCGAAACCAGTA-3' (MARCONE *et al.*, 1999; SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004; KUBE *et al.*, 2008). V roce 2007 byla dokončena genomová sekvence '*Ca. P. mali*' (kmen AT) (KUBE *et al.*, 2007 a 2008). Ačkoli jsou tyto tři fytoplazmy charakterizovány úzkými rozdíly ve velikosti chromozomů a vysokou podobností 16S rDNA sekvencí, prokázalo se, že jejich variabilita je mírně vyšší v oblasti

mezigenového mezerníku 16S–23S rDNA (SMART *et al.*, 1996) a koncentrovanější v sekvenci regionu kódujícího extracelulární oblast imunodominantního proteinu (IMP) (SEEMÜLLER a SCHNEIDER, 2004). IMP může hrát roli v interakci mezi patogenem a hostitelem, což by také mohlo vysvětlit vysokou specifickou ‘*Ca. P. mali*’, ‘*Ca. P. prunorum*’ a ‘*Ca. P. pyri*’ u různých rostlinných a hmyzích hostitelů (BERG *et al.*, 1999; BARBARA *et al.*, 2001, 2002; MORTON *et al.*, 2003).

Proliferace jabloně je jedním z nejvýznamnějších fytoplazmatických onemocnění jabloní, které postihuje téměř všechny kultivary a snižuje u nich velikost plodů, hmotnost a vnitřní kvalitu plodů. Významně také snižuje vzrůstnost stromů a zvyšuje náchylnost k chorobám, zejména k padlí jabloňovému (*Podospheera leucotricha* (Ellis & Everh.) E.S. Salmon) (MASZKIEWICZ *et al.*, 1980) a stříbřitosti listů (*Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar) (NÉMETH, 1986). Onemocnění bylo rovněž detekováno u genotypů rezistentních vůči strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis* (Cooce) G. Winter) (LOI *et al.*, 1995). Kořenový systém infikovaných stromů zůstává kolonizován po celý život zejména v případě, že jsou štěpovány na kulturních podnožích *Malus × domestica* (SCHAPER a SEEMÜLLER, 1982, 1984; SEEMÜLLER *et al.*, 1984a, b; CARRARO *et al.*, 2004).

Typickým příznakem onemocnění způsobeným ‘*Ca. P. mali*’ je tzv. metlovitost (proliferace oček letorostů) vytvářející se na konci letorostů, která je způsobená poruchou apikální dominance u takto postižených letorostů. U nemocných stromů jsou listy obecně menší a protáhlejší, s neobvykle zvětšenými palisty. Plody jsou menší (až o 50 %), zploštělé, jejich hmotnost může být redukována o 63–74 % a mají delší stopky a horší chuťové vlastnosti. Plodnost je nižší a nepravidelná. Může docházet i k pozdnímu a opakovanému kvetení. Velmi často dochází k předčasnému vybarvování listů (červenání) listů (KUNZE, 1989).

Distribuce fytoplazmy v rámci stromu je také závislá na teplotě. Ve Francii byly fytoplazmy nalezeny ve stromech při teplotách 21–25 °C za současného symptomatického projevu. Při teplotách 29–32 °C byly příznaky inhibovány a fytoplazmy byly zjištěny pouze v kořenech. Nicméně při nižší teplotě docházelo k opětovné rekolonizaci kmene.

Jabloň (*Malus* Mill.) je hlavním hostitelem ‘*Ca. P. mali*’. Způsob pěstování jabloní ovlivňuje interakce mezi patogenem a hostitelem, nicméně převážná většina odrůd je náchylná. Onemocnění lze

pozorovat buď na kulturních odrůdách, nebo na podnožích, a stejně tak na okrasných a divoce rostoucích zástupcích rodu *Malus*.

Obr. 12 Typická metlovistost (proliferace) na kosterních větvích jabloní.



Obr. 13 Prorůstající očka na letorostu jabloně jako symptom fytoplazmy proliferace jabloně.



Obr. 14 Typická metlovitost výhonů jabloně při infekci fytoplazmou proliferace jabloně (citlivá odrůda Golden Delicious).



Obr. 15 Vlevo detail prorůstajících letorostů z oček jako důsledek infekce AP.

Obr. 16 Vpravo již vytvořený „metlovitý“ přírůstek v období dozrávání plodů.



2.5.3 '*Candidatus Phytoplasma pyri*' – fytoplasma chřadnutí hrušně (PD)

Chřadnutí hrušně (synonyma: pear decline, phytoplasma pyri, decline of pear, leaf curl of pear, moria disease of pear atd.) způsobilo úhyn více než 50 000 stromů v Itálii během let 1945–1947. První popis onemocnění pochází z Britské Kolumbie již z roku 1948 (McLARTY, 1948) a během stejného roku ze státu Washington (BLODGETT *et al.*, 1955). O několik let později byla nemoc zjištěna i v Oregonu (BLODGETT *et al.*, 1955) a v Connecticutu (McINTYRE *et al.*, 1978). Po epidemickém výskytu choroby chřadnutí hrušně v Kalifornii v letech 1959–1961, v jejímž důsledku uhynulo více než zhruba jeden milión hrušní (NICHOLS *et al.*, 1960ab), byl výskyt onemocnění krátce poté hlášen i v dalších zemích. V současné době byl výskyt zaznamenán v evropských zemích, jako je Francie, Španělsko, Řecko, Itálie a Německo, v zemích Jižní Ameriky, jako je Argentina, a také v asijských zemích, jako je Írán a Tchaj-wan (SEEMÜLLER *et al.*, 1992).

Onemocnění je spojeno s řadou nespecifických příznaků: červenání listů, zvlnění listů, předčasný opad listů, defektní vývoj plodu, růstová deprese, pomalý nebo rychlý úhyn stromů.

Choroba se může rozvinout ve dvou podobách:

- a) u stromů, kde je floém poškozen do té míry, že v průběhu vegetace trpí kořenový systém deficitem živin v důsledku omezeného transportu asimilátů, dochází k vadnutí listů a plodů, následně k listové spále (hnědnutí) a odumření listů. Následuje úhyn, kdy rostlina odumře během několika týdnů.
- b) nastává progresivní oslabení stromu, které může být různě závažné. Terminální růst je oslaben nebo může být úplně potlačen. Počet listů je redukován a jsou malé, kožovité a světle zelené s mírně zvlněnými okraji, velikost plodů je redukována. Na podzim listy abnormálně vybarvují do červena a předčasně opadávají. Nastává pozvolný úhyn, při kterém rostlina pomalu chřadne a během několika let odumírá (BLOMQUIST *et al.*, 2002).

Symptomy přisuzované tomuto onemocnění se vyskytují v pozdním létě s vývojem předčasného vybarvení listu postižených stromů. Většina odrůd reaguje předčasným vybarvením listů do červena, ale některé odrůdy mohou předčasně vybarvovat do žluté barvy listů (SEEMÜLLER, 1992). Listy mohou mít menší listové čepele, některé se svinují a předčasně opadávají. Následující rok v jarním období stromy trpí růstovou depresí, listy se vyskytují často jen sporadicky a jsou nedokonale vybarvené (bledé). Intenzita jarních symptomů může být různá od absence až po úhyn. V pletivu kůry se mohou vyskytovat nekrotické léze. Tyto symptomy ale mohou mít mnoho dalších příčin (nedostatek vody, poškození kořene, disafinita s podnoží či jiné choroby nebo škůdci) (SEEMÜLLER a HARRIES, 2010).

Ačkoli je kvetení v počátečních fázích infekce poměrně bohaté a intenzivní, později je květní násada stejně jako násada plodů redukována. Růstová deprese v několika po sobě jdoucích vegetačních obdobích vede ke vzniku zakrslých výhonů připomínajících listové růžice. Většina vlásečnicových kořenů (nasávacích) odumírá, zatímco hlavní kořeny se zdají nepoškozené. Po odstranění kůry z místa štěpování je zřetelné hnědé zbarvení kambiálního pletiva. Symptom zbarvení pletiva neplatí důsledně a během vegetačního období může pletivo vyblednout (EPPO, 2006).

'*Ca. P. pyri*', která je fylogeneticky úzce spojená s '*Ca. P. mali*', reaguje v systému hostitel/patogen stejnou interakcí v kořenech podnoží jako '*Ca. P. mali*', respektive kolísáním koncentrace a rekolonizací do kmene, viz '*Ca. P. mali*' (SCHAPER a SEEMÜLLER, 1982; SEEMÜLLER *et al.*, 1984b). '*Ca. P. pyri*' se vyskytuje v plně vyvinutých sítkovicových buňkách floému postižených stromů. Detekovatelná je ale až v pozdním létě, na podzim a brzy v zimě (SCHAPER a SEEMÜLLER, 1982). Fytoplazmu obvykle nelze detekovat v nadzemních částech stromu na jaře, ale po celou dobu roku je detekovatelná v kořenech postižených stromů, pokud jsou stromy roubovány na hrušňových podnožích nebo jsou pravokořenné. Jsou-li stromy roubovány na některé kdouloňové podnože, detekce z kořenů je nespolehlivá. Patogen může být také v rámci stromu nerovnoměrně rozšířen, což vyžaduje pro diagnostiku odběr z několika různých částí stromu. Doporučuje se vyšetřit kůru dva až tři

roky starého dřeva ze tří různých částí stromu dohromady s jedním vzorkem z kmene (EPPO, 2006).

Během epidemie fytoplazmového onemocnění v západní části Severní Ameriky stromy na orientálních podnožích jako *P. pyrifolia* (syn. *P. serotina*) a *P. ussuriensis* trpěly onemocněním více než stromy na podnožích *P. calleryana* a *P. communis* cv. 'Bartlett' (syn. Williamsova, v USA se používá jako pravokořenná podnož). U těchto stromů byly pozorovány závažné histopatologické změny v sekundárním floému u citlivých podnoží, kde docházelo k vytváření kalózy v sítkovicích floému, k odumírání buněk sítkovic a vytváření nového floému. Kromě toho docházelo k akumulaci škrobu nad formacemi pupenů a k vyčerpání škrobu pod touto linií. Tyto symptomy jsou prokazatelně úzce spojené s intenzitou symptomů nadzemní části, proto byly u málo postižených podnoží nebo stromů mírné, nebo se nevyskytovaly vůbec. Z tohoto zjištění vyplývá, že translokace sacharidů z kmene do kořenů je ovlivněna fytoplazmou, což vede k úhynu stromů na citlivých podnožích (BATJER a SCHNEIDER, 1960; BLODGETT *et al.*, 1962). Proto se v oblasti výzkumu eliminace 'Ca. P. pyri' operuje s hypotézou, že náchylné odrůdy mohou být úspěšně pěstovány na odolných podnožích, podobně jako u jabloní.

Obr. 17 Vlevo zdravý letorost hrušně, vpravo letorost se symptomy fytoplazmy chřadnutí hrušně (Pear decline phytoplasma, PD).



Obr. 18 Typické svinování listů a růstová deprese jako projev infekce PD.



- Obr. 19** Charakteristická růstová deprese doprovázená svinováním listů.
Obr. 20 Předčasné vybarvování listů hrušní jako projev infekce PD.



- Obr. 21** Vlevo zdravý strom, vpravo strom vykazující červenání listů jako symptom fytoplazmy chřadnutí hrušně (odrůda Packham's Triumph).



Obr. 22 Vlevo symptomatické stromy s celkovým projevem chřadnutí stromu, vpravo zdravé stromy (odrůda Williamsova).



2.6 Detekce fytoplazem ze skupiny 16 SrX

Fytoplazmy se ve floému ovocných dřevin vyskytují v nižších koncentracích a jejich rozmístění v rostlině je nerovnoměrné (LEE *et al.*, 2000). Výběr detekční metody patří k zásadnímu kroku při analýze rostlinných vzorků. V současnosti je k dispozici množství metod i protokolů lišících se finanční, technickou i personální náročností, ale i citlivostí a specifitou.

Detekce fytoplazem biologickými metodami s využitím elektronového mikroskopu a barviva 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) patří mezi nespecifické metody, které se vyznačují nízkou citlivostí a finančně náročným technickým vybavením. Využití dřevitých indikátorů patří ke specifitějším metodám a spolu s metodou DAPI je doporučeno k využití v certifikačním schématu pro produkci certifikovaného rostlinného materiálu (EPPO, 1999; EPPO, 2001). Tyto metody ale nejsou vhodné pro rutinní diagnostiku velkého množství vzorků.

Molekulární metody na bázi PCR patří v současnosti k rutinním metodám využívaným k identifikaci a diagnostice fytoplazem. Těmito metodami je možné detekovat fytoplazmy napadající ovocné dřeviny na úrovni 16 SrX skupiny (SEEMÜLLER *et al.*, 1998b), ve které se nacházejí druhy ‘*Ca. P. prunorum*’, ‘*Ca. P. mali*’ i ‘*Ca. P. pyri*’, ale i na úrovni druhu (LORENZ *et al.*, 1995; JARAUSCH *et al.*, 1998). Základní metodou v diagnostice fytoplazem ze skupiny 16 SrX je nested PCR s následnou analýzou RFLP (restriction fragment length polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů) (EPPO, 2017). Umožňuje detekovat a identifikovat patogen s vyšší citlivostí než klasická jednokroková PCR. Nástupem real-time PCR se zvýšila rychlost i citlivost detekce a zároveň se v porovnání s nested PCR snížilo riziko kontaminace, jelikož odpadá potřeba dvojkrokové PCR. Tak jako u konvenčních PCR protokolů, jsou i u metody real-time PCR k dispozici protokoly pro univerzální (TORRES *et al.*, 2005; CHRISTENSEN *et al.*, 2004) i specifickou detekci fytoplazem ze skupiny 16 SrX (JARAUSCH *et al.*, 2003; NIKOLIC *et al.*, 2010; YVON *et al.*, 2009). Kromě detekce umožňuje real-time PCR navíc i kvantifikovat cílový úsek DNA ve vzorku. Real-time PCR se i přes vyšší finanční náročnost na přístrojové vybavení stává díky těmto výhodám velmi využívanou technikou.

2.6.1 Popis metody real-time PCR

Rozdíl mezi metodami PCR a real-time PCR je v použití fluorescenčního barviva, které indikuje nárůst amplifikovaného úseku DNA v PCR reakci. Nejčastěji se fluorescenční barva přímo interkaluje do amplifikovaného úseku DNA nebo může být ve formě reporteru naligována na oligonukleotidu (tzv. hydrolyzační sonda), čímž se zvyšuje specifita detekce. Využitím citlivých detektorů na zaznamenání fluorescenčního signálu se výrazně zvyšuje citlivost detekce oproti PCR. Díky zaznamenání fluorescenčního signálu v každém PCR cyklu je možné přesně určit cyklus, ve kterém došlo k nárůstu fluorescence. Vzorek je vyhodnocen jako pozitivní, když fluorescenční křivka protne tzv. threshold a zaznamená se hodnota ct (threshold cycle). Threshold se nastavuje po ukončení PCR do oblasti, kde je nárůst fluorescence v exponenciální fázi a kopíruje

exponenciální nárůst počtu PCR produktů ve vzorku (Obr. 23). V porovnání s metodou end-point PCR dochází k rozdílnému zaznamenávání positivity, jelikož u konvenčních metod PCR je výsledek amplifikace sledován až na úrovni plateau fáze, ale u metody real-time PCR je výsledek amplifikace sledován již ve fázi exponenciální (Obr. 23).

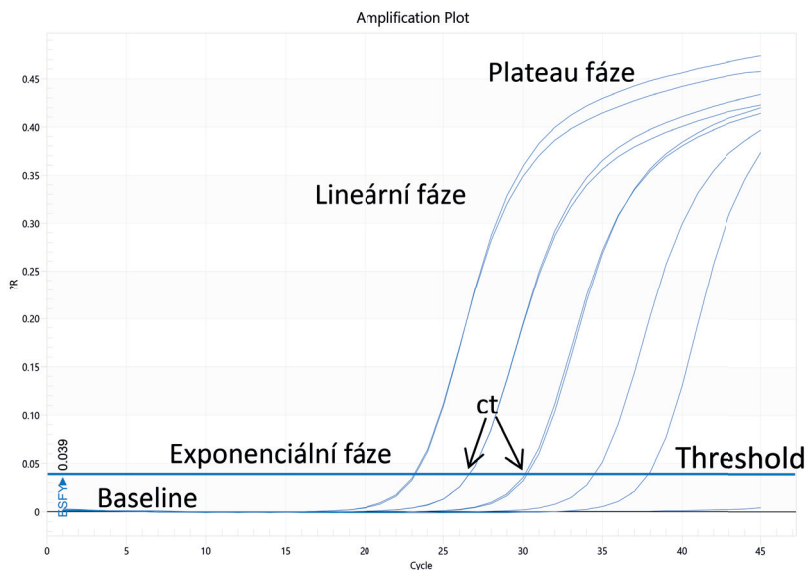
Real-time PCR umožňuje kvantifikovat cílový úsek DNA relativně, nebo absolutně. Dále bude text zaměřen na popis absolutní kvantifikace, který se používá pro určení koncentrace fytoplazem v rostlinných pletivech.

V ideálních podmínkách dochází v jednom cyklu PCR k zdvojení amplifikovaného úseku DNA. Empiricky vypočtené z rovnice $2^n = 10$ (n: počet PCR cyklů; 10: desetinásobné ředění) dochází v PCR reakci při ideálních podmínkách k desetinásobnému namnožení amplifikovaného úseku každých 3,32 cyklu (BUSTIN *et al.*, 2012). Platí tedy, že mezi dvěma vzorky, jejichž rozdíl koncentrací cílového úseku DNA je desetinásobný, bude rozdíl ct hodnot 3,32. Při absolutní kvantifikaci metodou real-time PCR je při použití standardů se známými koncentracemi cílového úseku DNA možné zpětně vypočítat vstupní koncentraci cílového úseku DNA v neznámém vzorku. V real-time PCR se desetinásobný rozdíl množství cílového úseku DNA označuje jako k (slope) a vychází z analýzy standardní křivky, kde na ose y jsou hodnoty ct a na ose x logaritmické vyjádření koncentrace (Obr. 24). Platí, že logaritmické vyjádření koncentrace je negativně korelováno k hodnotám ct (BUSTIN *et al.*, 2012). Optimální hodnota k (slope) je $-3,32$. Kvalitu amplifikace udává efektivita, která se počítá z údajů slope a je vyjádřena jako $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ a je zpravidla přepočtena do procentuálního vyjádření $\%E = (E-1) \times 100 \%$. Při optimálních podmínkách, kde ke zdvojení dochází v každém cyklu, je $E = 10^{(-1/-3,32)} = 2$ a $\%E$ je $(2-1) \times 100 \% = 100 \%$ (BUSTIN *et al.*, 2012). V praxi je akceptovatelné rozmezí mezi 90 a 110 % efektivit amplifikace (BUSTIN *et al.*, 2012).

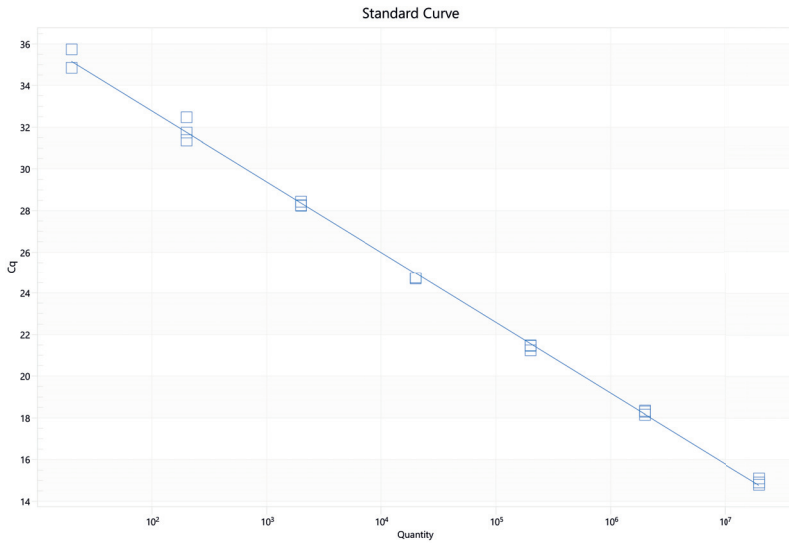
Pro evaluaci i optimalizaci běhu real-time PCR je nutné použít technické replikace (vzorky a standardy alespoň v triplikátech). Stabilní protokol má hodnoty korelačního koeficientu (R^2) standardní křivky vyšší než 0,99. U neznámých vzorků je opakovatelnost vyjádřena jako standardní chyba (SD, standard deviation) a neměla

by převyšovat hodnoty 0,5 (BUSTIN *et al.*, 2012). Hodnoty SD nad 0,5 indikují u vzorků s množstvím cílového úseku DNA vyšším jak 10^1 kopií málo optimalizovaný protokol nebo pipetovací chybu. U vzorků s nízkým množstvím cílového úseku DNA (řádově 10^0 – 10^1 kopií) jsou pak hodnoty nad 0,5 dány stochasticky. Z rovnice standardní křivky je následně možné vypočítat koncentraci cílového úseku DNA neznámého vzorku na základě jeho hodnoty ct. Přesné stanovení koncentrace fytoplazem ve vzorcích má převážně vědecký smysl. Umožňuje tak sledovat např. fluktuaci fytoplazmy v pletivech rostlin v průběhu roku.

Obr. 23 Graf průběhu fluorescence u real-time PCR.
ct: threshold cycle.



Obr. 24 Standardní křivka z real-time PCR vytvořená ze 7 dilučních bodů. %E (efektivita amplifikace): 97,09; R^2 (korelační koeficient): 0,998; k (slope): -3,39.



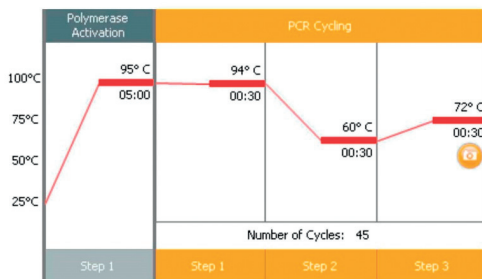
Obr. 25 Příklad rozložení vzorků, standardní řady, negativky a blanku při kvantifikaci na mikrotitrační destičce.

Plate Layout



Obr. 26 Průběh jednotlivých kroků programu vizualizovaných na real-time termocykleru.

Thermal Profile



2.7 Výsledky experimentů

2.7.1 Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin ze skupiny 16 SrX pomocí real-time PCR

Pro potřeby certifikované metodiky byl vybrán real-time PCR protokol podle CHRISTENSEN *et al.* (2004), který posloužil na optimalizaci pro absolutní kvantifikaci fytoplazem ze skupiny 16 SrX ('*Ca. P. prunorum*', '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. pyri*') v pletivech druhů rodu *Prunus*, *Malus* a *Pyrus*. Jelikož je tento protokol univerzální, umožňuje detekci různých druhů fytoplazem z různých skupin. Pro jiné konkrétní fytoplazmy je vhodné ověřit, popřípadě modifikovat princip odběru vzorků, protokol pro izolaci DNA, ale i samotný real-time PCR protokol. Oproti klasické detekci fytoplazem pomocí real-time PCR je pro potřeby absolutní kvantifikace nutné zvýšit pozornost hlavně při úpravě vzorků a izolaci DNA.

Odběr vzorků a jejich úprava

Kvantifikovat fytoplazmy ze skupiny 16 SrX je možné ve všech rostlinných částech, které jsou používány pro konvenční PCR detekci těchto fytoplazem: středová žilnatina listů, listové řapíky, lýko výhonů a segmenty kořenů.

Vzorek by měl být průměrný a rovnoměrně odebraný z analyzované části rostliny. U všech rostlin, které se budou porovnávat, je nutné odebrat vzorky ze stejné části rostliny, aby se předešlo nesrovnalostem při vyhodnocování dat. Řádně označené a zabalené vzorky se v co nejkratší době dopraví do laboratoře, kde z nich bude izolována DNA. Je dobré minimalizovat všechny vlivy, které by mohly mít za následek, že koncentrace fytoplazmy v pletivech nebude mezi vzorky srovnatelná. Proto by měly být všechny faktory, které může odběratel ovlivnit (odebíraná rostlinná část, doba mezi odběrem a zpracováním vzorku, uskladnění apod.), stejné pro všechny vzorky. Pozornost by měla být věnována i období odběru vzorků, jelikož koncentrace fytoplazem v rostlinných pletivech se v průběhu roku mění (NEČAS *et al.*, 2005; 2008) a tím ovlivňuje i účinnost kvantifikace hlavně u rostlin, kde se předpokládá nižší koncentrace fytoplazmy v pletivech.

Izolace DNA

Metodik na izolaci DNA za účelem detekce fytoplazem ze skupiny 16 SrX je hned několik. Pro potřeby kvantifikace fytoplazmy je nutné používat přesné množství pufrů a vážit vzorky před homogenizací. Proto ne každý protokol používaný pro detekci fytoplazem je vhodný i pro kvantifikaci, případně je potřeba určité kroky modifikovat. Je vhodné mít na paměti, že pro kvantifikaci fytoplazem v pletivech se vybírají rostliny, u kterých je známa pozitivita na fytoplazmy. Je proto možné použít izolační protokoly, které mají i nižší zisk vyzískané DNA, ale zato vysoké kvality.

Pro izolaci DNA z rostlinných pletiv bude popsán modifikovaný protokol podle MAIXNERA *et al.* (1995). Extrakční pufr sestává z 2% CTAB, 2% PVP 25, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0) a 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), který se po rozpuštění všech komponentů sterilizuje v autoklávu. Všechny zkumavky, skalpely i špičky jsou před samotnou izolací sterilizovány v autoklávu a pracovní povrchy umyty a dekontaminovány vhodnými prostředky. Chemické látky použité k izolaci by měly být co nejvyšší kvality (minimálně microbiology/HPLC grade).

Postup:

1. Ze segmentů kořenů nebo výhonů se odstraní asi 0,5 cm spodní části, která je zpravidla zoxidovaná a nevhodná na izolaci DNA. Sterilním skalpelem se odstraní kůra a naškrábané lýko se ihned vloží do extrakčního vaku Bioreba (CH) (používané v ELISA testech). V případě listových řapíků a středové žilnatiny se skalpelem odstraní čepel listů a takto připravený rostlinný materiál se vloží do extrakčního vaku Bioreba. Extrakční vaky se zváží na přesných vahách s přesností na 1 mg před a po vložení rostlinného materiálu. Z jejich rozdílu se stanoví přesná váha vzorku. Do extrakčního vaku s rostlinným materiálem se nadávkuje 6 ml extrakčního pufru. Podle zkušeností s rodem *Prunus*, *Malus* i *Pyrus* je optimální množství rostlinného vzorku mezi 200 až 300 mg na 6 ml extrakčního pufru. U jiných rostlinných druhů se tento poměr může lišit. Vaky se následně udržují v ledové tříšti.

2. Vzorky ve vacích se zhomogenizují ručním homogenizérem (Bioreba, CH) nebo semiautomatickým homogenizérem Homex 6 (Bioreba, CH).
3. Zhruba 1,5 až 2 ml homogenátu se převede do 2ml centrifugační zkumavky.
4. Centrifugace se provádí 4 minuty při 2 200 g při pokojové teplotě.
5. Ze supernatantu se odpipetuje 1 ml do nové 2 ml centrifugační zkumavky typu Safe-Lock (Eppendorf, Německo).
6. Vzorky se inkubují po dobu 45 min. při 65 °C (vodní lázeň nebo heat block).
7. Ke vzorkům se přidá 1 ml směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1) a obě fáze se promíchají asi 1 min. obracením zkumavek.
8. Následuje centrifugace 5 minut při 16 000 g při pokojové teplotě.
9. Celková vodní fáze (zhruba 850 až 900 µl) se odpipetuje do 1,5 ml centrifugační zkumavky.
10. K 1 x objemu vodní fáze se přidá 0,8 x objem isopropanolu (v případě 900 µl vodní fáze je to 720 µl isopropanolu; v případě 850 µl vodní fáze 680 µl isopropanolu) a obě fáze se promíchají 1 minutu obracením zkumavek.
11. Následuje inkubace 15 minut při pokojové teplotě.
12. Poté se provede centrifugace 15 minut při 16 000 g při 4 °C.
13. Supernatant se odstarní a zkumavky se přiloží k filtračnímu papíru dnem vzhůru. Je nutné zvýšit pozornost, aby nedošlo ke ztrátě peletu při vylévání supernatantu.
14. Pelet se přemyje 500 µl 70% etanolu, aby se odlepil od stěny zkumavky.
15. Znovu se provede centrifugace 10 minut při 16 000 g při 4 °C.
16. Supernatant se odstarní a zkumavky se přiloží k filtračnímu papíru dnem vzhůru. Je nutné zvýšit pozornost, aby nedošlo ke ztrátě peletu při vylévání supernatantu.
17. Opakují se body 14–16.
18. Pelet se vysuší v centrifugačním DNA koncentrátoru (45 min). Pelet by měl být po vysušení průsvitný.
19. Pelet se resuspenduje ve 100 µl rozpouštědla (ddH₂O, TE pufr).

Je možné využít také izolaci DNA kolonkovým komerčním kitem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, DE), kde je nutné odvážit vstupní množství rostlinného materiálu po homogenizaci (obecně doporučováno 100 mg), ze kterého je izolována DNA.

Izolace DNA podle MAIXNERA *et al.* (1995) i DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, DE) byly otestovány na kvalitu izolace DNA. U obou izolačních protokolů byly smíchány homogenáty vybraného pozitivního a negativního vzorku v poměrech 1:0, 1:1, 1:4, 1:9 a 1:99, přičemž se získala 100násobná ředící řada, která posloužila na vytvoření standardní křivky v real-time PCR. Vlastnosti standardních křivek následně sloužily k vyhodnocení kvality izolační metody. DNA byla izolována zvláště z listových řapíků a lýka z pozitivní/negativní jabloně a meruňky. Vzorky DNA byly analyzovány v triplikátech s real-time PCR protokolem podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) (popsáno v této metodice) v real-time PCR cykleru ECO (Illumina, USA).

I navzdory variabilitě v efektivitě amplifikace (Tab. 1), která byla v rozmezí akceptovatelných 90–110 %, obě izolační metody prokázaly schopnost věrohodně izolovat DNA fytoplazem různé koncentrace z různých částí rostlinných pletiv jabloní i meruněk. Větší odchylky korelačního koeficientu od optimální hodnoty 0,99 při DNeasy Plant Mini Kit (Tab. 1 a Obr. 28) byly způsobeny pravděpodobně nerovnoměrnou distribucí buněk fytoplazmy v homogenizovaném rostlinném vzorku, kde na rozdíl od kapalného homogenátu u protokolu MAIXNERA *et al.* (1995) byl u DNeasy Plant Mini Kit vzorek připraven homogenizací zmraženého rostlinného vzorku tloučkem v misce. Standardní křivky (Obr. 27 a 28) obou izolačních metod jsou rovnoběžné a nevykazují výrazné odlišnosti v závislosti na rostlinném druhu ani rostlinné části. Z obrázku 27 i 28 je patrný rozdíl v ct hodnotách mezi izolačními metodami u stejných vzorků, kde vzorky izolované protokolem MAIXNERA *et al.* (1995) dosahovaly obecně nižší hodnoty ct než vzorky izolované kitem DNeasy Plant Mini Kit. Proto u vzorků, kde se předpokládá nízká koncentrace fytoplazem, je vhodnější použít protokol podle MAIXNERA *et al.* (1995), u kterého je vstupní množství rostlinného pletiva pro izolaci i celková výtěžnost DNA vyšší než při použití DNeasy Plant Mini Kit. Zhodnocení CTAB+PVP

(cetyltrimethylamonium bromid + polyvinylpyrrolidon) protokolů a komerčních kitů pro detekci fytoplazem je popsáno v práci MAŠKOVÉ *et al.* (2009).

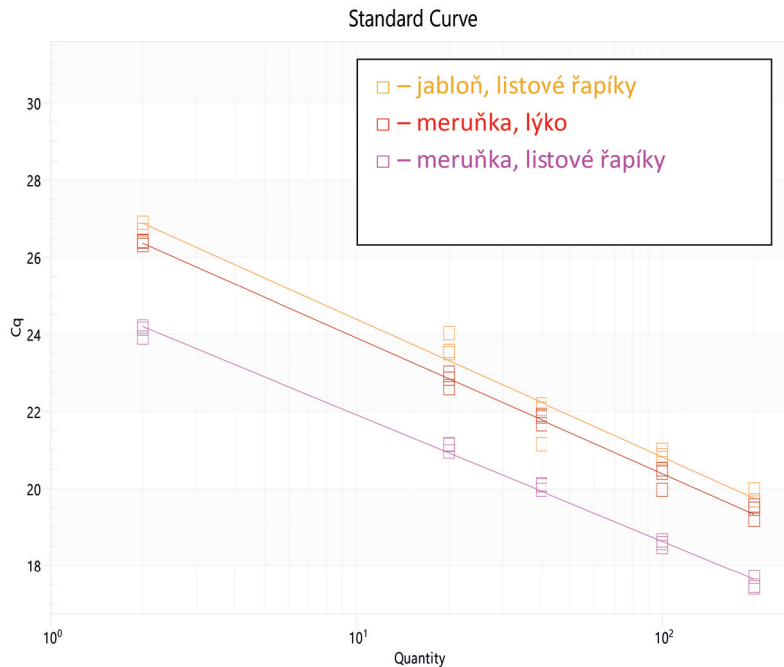
Tab. 1 Vlastnosti dilučních řad z real-time PCR podle protokolu CHRISTENSEN *et al.* (2004) ze vzorků izolovaných různými protokoly z různých částí jabloní a meruněk.

Izolační protokol	Rostlinný materiál	%E	Slope (k)	R ²
Maixner <i>et al.</i> (1995)	jabloň, listové řapíky	90,62	-3,57	0,973
	meruňka, lýko	92,43	-3,52	0,995
	meruňka, listové řapíky	101,89	-3,28	0,996
DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	jabloň, lýko	105,24	-3,20	0,992
	jabloň, listové řapíky	98,32	-3,36	0,965
	meruňka, lýko	110,78	-3,09	0,978
	meruňka, listové řapíky	110,73	-3,09	0,903

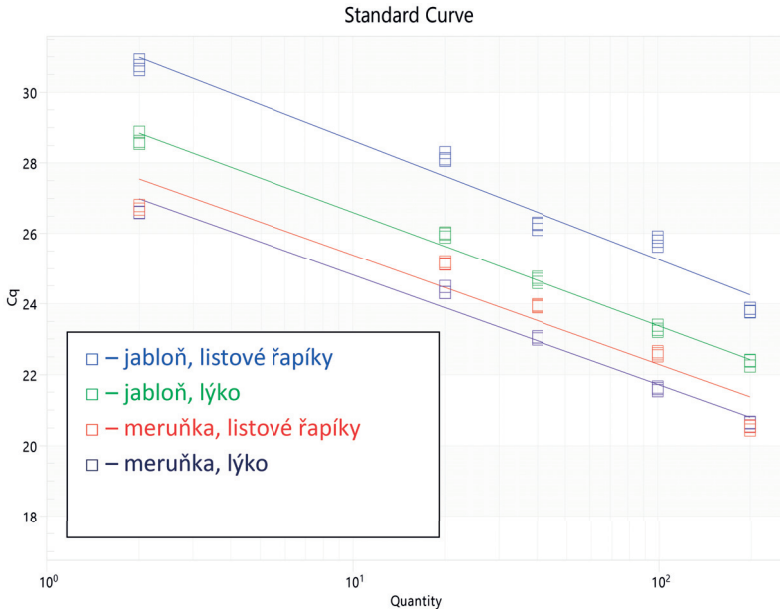
R²: korelační koeficient, E: efektivita amplifikace

Metodika podle NAVRÁTILA *et al.* (2009) nebyla pro kvantifikaci fytoplazem ověřována. Tato metodika je rutinně využívána v diagnostice fytoplazem ze skupiny 16 SrX a využívá tzv. enrichment, kde dochází ke snížení poměru rostlinné DNA k fytoplazmózní DNA, a je zaměřena na získání co nejvyšší kvantity fytoplazmózní DNA. Proto by byl přepočet koncentrace fytoplazem na jednotky rostlinného pletiva nepřesný.

Obr. 27 Standardní křivky dilučních řad z real-time PCR podle protokolu CHRISTENSEN *et al.* (2004) ze vzorků izolovaných protokolem podle MAIXNERA *et al.* (1995) z různých částí jabloní a meruněk.



Obr. 28 Standardní křivky dilučních řad z real-time PCR podle protokolu CHRISTENSEN *et al.* (2004) ze vzorků izolovaných soupravou DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo) z různých částí jableň a meruňek.



Ověření kvality vyizolované DNA

Kvalita izolace DNA se může stanovovat různými technikami. Jednou z nejjednodušších metod je stanovení koncentrace a čistoty spektrofotometricky. Kvalita vyizolované DNA se v tomto případě stanovuje jako poměr absorbancí A 260/230 nm a A 260/280 nm. Poměr absorbancí A 260/230 nm by optimálně měl mít hodnoty 1,8–2,2. Výrazné odchylky od této hodnoty značí kontaminace např. fenolickými sloučeninami, uhlovodíky, EDTA nebo i guanidinem isothiokyanátem. Poměr absorbancí A 260/280 nm by měl mít optimálně hodnoty $\pm 1,8$. Výrazně nižší odchylky od této hodnoty mohou značit kontaminaci proteiny, fenolem i jinými kontaminanty absorbujícími světelné délky v okolí 280 nm.

(<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Nucleic-Acid-Technical-Guide-EN.pdf>)

K dalším metodám stanovení kvality vyizolované DNA patří kvantifikace rostlinného referenčního genu metodou real-time PCR. Referenční geny jsou zapojené ve vykonávání základních funkcí v buňkách a jejich výskyt v genetické informaci buněk je konstantní (EISENBERG a LEVANON, 2013). Ct hodnoty referenčních genů v real-time PCR by měly být u všech vzorků podobné. Výrazné odchylky ct hodnot, vyšší nebo nižší než průměr, indikují nežádoucí změny při izolaci DNA. V takových případech je vhodné vzorek z testování vyřadit. Při vyhodnocování odchylek od průměrných hodnot ct je potřeba zhodnotit hmotnost navážky a část rostlinného materiálu, ze kterého byla DNA izolována. Vyřadit vzorky s velkými odchylkami je možné, pokud byla DNA izolována ze stejné rostlinné části a vzorky měly přibližně takovou hmotnost jako ostatní vzorky. U rostlin je možné použít protokol na bázi hydrolyzačních sond pro detekci genu 18S rRNA (CHRISTENSEN *et al.*, 2004). Protokoly pro kvantifikaci referenčního genu a fytoplazem je možné multiplexovat do jedné real-time PCR reakce. Tato certifikovaná metodika je zaměřena na metodologický postup kvantifikace fytoplazem, a proto multiplex real-time PCR protokol zde nebude popisován.

Real-time PCR protokol

Vzorky DNA s adekvátní kvalitou vyizolované DNA je možné dále použít pro kvantifikaci fytoplazmózní DNA. V současnosti je k dispozici několik real-time PCR protokolů sloužících k detekci i kvantifikaci fytoplazem. Pro certifikovanou metodiku byl vybrán protokol podle CHRISTENSEN *et al.* (2004). Tento protokol patří mezi univerzální protokoly, které umožňují detekovat a kvantifikovat kromě fytoplazem ze skupiny 16 SrX i většinu ostatních známých fytoplazem. Protokol doporučuje organizace EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) v návodu PM 7/62 (ANONYM, 2017) pro detekci fytoplazem ze skupiny 16 SrX. V práci KISSE *et al.* (2016) byly pro detekci fytoplazem ze skupiny 16 SrX porovnány real-time PCR protokoly na bázi interkalačních barviv

(JARAUSCH *et al.*, 2003; YVON *et al.*, 2009) i hydrolyzačních sond (NIKOLIC *et al.*, 2010; CHRISTENSEN *et al.*, 2004). Protokoly na bázi hydrolyzačních sond prokázaly desetinásobně vyšší citlivost než protokoly na bázi interkalačního barviva, přičemž mezi protokoly na bázi hydrolyzačních sond byl protokol podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) nejcitlivější (hodnoty $LOD_{95\%}$ – limit detekce na úrovni 95 %) při srovnatelné efektivitě amplifikace i korelačního koeficientu s ostatními protokoly (Tab. 2).

Tab. 2 Porovnání vlastností protokolů real-time PCR k detekci fytoplazem ze skupiny 16 SrX. Tabulka převzata z publikace KISS *et al.* (2016).

Patogen	Protokol real-time PCR	LOD _{95%} (kopíí)	Detekční limit nested PCR (kopíí)	Lineární regrese		
				Slope (k)	R ²	% E
Ca. P. prunorum	Christensen <i>et al.</i> 2004	7,08x10 ²	6,93x10 ²	-3,59	0,999	90,01
	Nikolic <i>et al.</i> 2010 ^a	7,08x10 ²		-3,45	0,998	94,87
	Yvon <i>et al.</i> 2009	7,07x10 ³		-3,74	0,996	84,99
	Jarausich <i>et al.</i> 1998	3,83x10 ³		-3,67	0,996	87,27
Ca. P. mali	Christensen <i>et al.</i> 2004	5,87x10 ¹	2,67x10 ³	-3,46	0,998	94,41
	Nikolic <i>et al.</i> 2010 ^b	5,28x10 ²		-3,46	0,994	94,69
Ca. P. pyri	Christensen <i>et al.</i> 2004	7,05x10 ¹	2,96x10 ³	-3,67	0,997	87,32
	Nikolic <i>et al.</i> 2010 ^c	3,02x10 ³		-3,74	0,992	85,00

LOD_{95%}: limit detekce na úrovni 95 %, kde 95 % vzorků s danou koncentrací je pozitivních.

Kalkulace vypočtena v programu R.

Nested PCR: použité primery P1/P7 a f01/r01

^a použita ESFY sonda; ^b použita AP sonda; ^c použita PD sonda

Sekvence oligonukleotidů a hydrolyzační Taqman sondy, složení reakce a teplotní profil real-time PCR protokolu CHRISTENSEN *et al.* (2004) jsou uvedeny v tabulkách 3, 4 a 5. PCR protokol je založen na reagentech firmy Promega. Sonda 16S rDNA má na 3' konci oligonukleotidu naligovaný zhášec BHQ1 (Black Hole Quencher 1), narozdíl od TAMRA (tetramethylrhodamine) použitého v původním protokolu. Na provedení protokolu tato změna nemá vliv. Na real-time PCR cykleru je nutné nastavit při výběru reporteru možnost FAM (absorpce při 495 nm a emise při 520 nm) a při výběru

zhášeče (quencher) nefluorescentní zhášeč. Jelikož se jedná o použití hydrolyzačních sond, analýza bodu tání produktu (melt curve analysis) není potřebná. Pozitivní kontrola, negativní kontrola a kontrola bez DNA jsou kontrolními vzorky kvality každého real-time PCR běhu.

Tab. 3 Sekvence oligonukleotidů pro kvantifikaci fytoplazem AP skupiny pomocí protokolu real-time PCR podle CHRISTENSEN *et al.* (2004).

Oligonukleotid	Sekvence
16S rDNA (Forward primer)	5´-CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA-3´
16S rDNA (Sonda)	5´ FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG -3´ BHQ1
16S rDNA (Reverse primer)	5´-TCTTCGAATTAACAACATGATCCA-3´

FAM – 6-carboxyfluorescein, reporter
BHQ1 – Black Hole Quencher 1, zhášeč

Tab. 4 Objem a koncentrace reagensů a vzorku DNA pro reakční směs protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004).

Reagence	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace	Objem na 1 reakci (µl)
PCR grade voda			8,4
5X Colorless GoTaq Reaction Buffer (Promega)*	5X	1x	4,0
dNTP's (Promega)	10 mM (mix)	0,5 mM (mix)	1,0
MgCl ₂ solution (Promega)	25 mM	2 mM	1,6
Forward primer (16S rDNA)	10 µM	0,3 µM	0,6
Reverse primer (16S rDNA)	10 µM	0,9 µM	1,8
Sonda (16S rDNA)	10 µM	0,2 µM	0,4
GoTaq G2 DNA Polymerase (Promega)	5 U/µl	1 U	0,2
DNA			2,0
Celkem			20,0

* neobsahuje Mg²⁺

Tab. 5 Teplotní profil, doba a počet cyklů protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004).

Krok	Teplota (°C)	Doba (mm:ss)	Počet cyklů
Aktivace polymerázy	95	02:00	1
Denaturace	95	00:15	40
Annealing + elongace	60	01:00	40

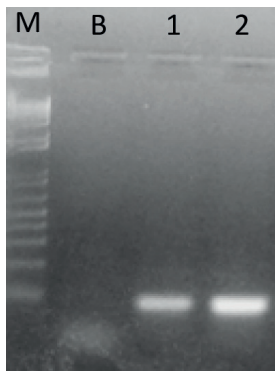
Instrumentace pro real-time PCR

Výše popsaný protokol je možné použít v každém real-time PCR cykleru, který má světelný zdroj a detektor umožňující excitaci a zaznamenání fluorescence reporteru FAM (absorpce při 495 nm a emise při 520 nm). Objem reagensů je optimalizován pro ECO real-time PCR cykler (Illumina), který nevyžaduje ROX normalizaci. Pro ROX normalizaci je potřeba protokol optimalizovat a validovat. Po optimalizaci je možné použít také jiný typ reporteru s příslušným zhasičem, pokud by real-time PCR cykler možnost použití FAM nepodporoval.

Příprava standardu

Samotná kvantifikace cílového úseku DNA vzorku je možná díky použití standardu se známou koncentrací cílového úseku DNA. Vytvořením diluční řady standardu a následně standardní křivky je možné vypočítat původní koncentraci cílového úseku DNA ve vzorku. Samotný standard a kvalita jeho přípravy má vliv na stabilitu a opakovatelnost přípravy standardní křivky a tím i na kvalitu kvantifikace. Jako standard může posloužit genomická DNA, RT-PCR produkt, rekombinantní plazmid DNA, komerčně syntetizované oligonukleotidy nebo umělé geny (PFAFFL, 2004). Genomická DNA, umělé geny a rekombinantní plazmidy DNA patří k nejnestabilnějším standardům a vykazují vysokou míru opakovatelnosti i po několika letech uchování při -20 °C (PFAFFL, 2012). Pro potřeby certifikované metodiky byl standard připraven ve formě rekombinantního DNA plazmidu. Pokud budou opakovatelnost a kvalita standardních křivek porovnatelné, je možné použít jakýkoliv výše popsaný způsob přípravy standardu i pro protokol real-time PCR podle CHRISTENSEN *et al.* (2004).

Obr. 29 Elektroforetická fotka separovaného PCR produktu podle protokolu CHRISTENSEN *et al.* (2004). M: 100 bp DNA Ladder (NEB, GB); B: blank; 1 a 2: PCR produkt.



Obr. 30 Šedou barvou jsou zvýrazněny regiony komplementární nebo totožné se sondou (tučné podtržené písmo) a forward (tučné písmo) a reverse (podtržené písmo) primerem protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004). Region je dlouhý 75 bp a nachází se mezi 865. a 939. nukleotidem u ‘*Ca. P. prunorum*’ (Acc. No. AJ542545.1) a ‘*Ca. P. mali*’ (Acc. No. X68375.2) a mezi 860. a 934. nukleotidem u ‘*Ca. P. pyri*’ (Acc. No. Y16392.1).

```
5'ATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCA
AGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCG
CACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGA
TACACGAAAAACCTTACCAGG 3'
```

Přípravě standardu předcházela purifikace PCR produktu. Vybraný DNA vzorek meruňky pozitivní na přítomnost ‘*Ca. P. prunorum*’ byl použit na PCR amplifikaci podle protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) (Tab. 3, 4 a 5), přičemž objem sondy byl nahrazen, PCR grade vodou. Amplifikovaný region DNA je pro fytoplazmy univerzální (Obr. 30), proto je možné použít i DNA vzorky s potvrzenou přítomností ‘*Ca. P. mali*’ i ‘*Ca. P. pyri*’. PCR

produkty byly separovány na 1% agarózovém gelu v elektroforéze a vizualizovány interkalační barvou GelRed (Biotium, USA) v dávce 4 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ gelu. PCR produkt má velikost 75 bp (Obr. 29 a 30), proto je nutné dávat pozor, aby nedošlo ke ztrátě produktu příliš dlouhým během elektroforézy.

Po potvrzení přítomnosti PCR produktu na UV transiluminátoru byl PCR produkt z gelu opatrně vyřezán tak, aby byl co nejkartší dobu vystaven UV záření. Vyřezané díly gelu s PCR produktem byly purifikovány kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machrey-Nagel, Německo) podle návodu.

Po určení kvality a kvantity purifikovaného PCR produktu byl standard připraven (např. fa. Generi Biotech, ČR) zaklonováním purifikovaného PCR produktu do plazmidu. Plazmid se zaklonováním PCR produktem byl vložen do vektoru a kultivován. Extrakcí plazmidu a určením jeho kvantity byl firmou dodán standard s konkrétním počtem kopií cílového úseku DNA na mikrolitr, konkrétně 10^9 kopií. μl^{-1} .

Vytvoření diluční řady standardu

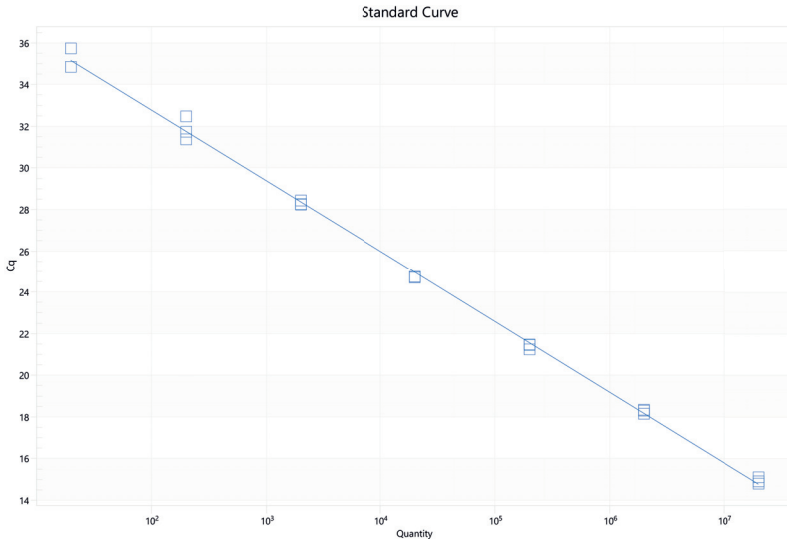
Pro věrohodnou interpretaci výsledků jsou diluční řady připraveny ředěním standardu v rostlinné DNA testované negativně na přítomnost fytoplazem. Negativní rostlinná DNA by měla být vyizolována stejným izolačním protokolem a z druhu stejného nebo příbuzného k testovaným vzorkům. Takto připravené body diluční řady nejlépe reprezentují podmínky, které vznikají během amplifikace v testovaných vzorcích. Standard se zpravidla ředí desetinasobně. Takto je možné získat ze standardu původní koncentrace 10^9 kopií. μl^{-1} osmibodovou diluční řadu pokrývající koncentrace od 10^8 kopií. μl^{-1} po 10^1 kopií. μl^{-1} . Příklad: do první z 8 kusů mikrozkušavek s 18 μl rostlinné DNA testované negativně na fytoplazmy se napipetují 2 μl standardu o koncentraci 10^9 kopií. μl^{-1} , získá se tak směs s koncentrací 10^8 kopií. μl^{-1} . Směs se krátce zortexuje a stočí. Novou špičkou se napipetují 2 μl ze směsi s koncentrací 10^8 kopií. μl^{-1} a vloží se do další zkumavky s připravenými 18 μl negativní rostlinné DNA. Získá se tak směs s koncentrací 10^7 kopií. μl^{-1} . Proces se opakuje až do posledního dilučního bodu. Takto připravenou diluční řadu je možné uchovávat jako běžné DNA vzorky.

Vyhodnocení standardní křivky

Před samotnou absolutní kvantifikací cílového úseku DNA neznámých vzorků je vhodné otestovat kvalitu dilučních bodů vytvořením standardní křivky a analýzou hodnot slope (k), efektivity amplifikace (E) a korelačního koeficientu (R^2). Ideální je porovnat nově vytvořenou standardní křivku s předcházející a v případě velkých odlišností je vhodné vytvořit diluční řadu znovu a otestovat ji stejným způsobem. Standardní křivka by měla pokrývat co největší rozsah koncentrace cílového úseku DNA, minimálně 6 bodů desetinásobné diluční řady (BUSTIN *et al.*, 2012).

Na obrázku 31 je standardní křivka, která byla vytvořena výše popsanými postupy pro přípravu reakční směsi PCR, standardu, diluční řady standardu. Reakce proběhly v real-time PCR cyklu ECO (Illumina, USA) podle výše popsaného teplotního protokolu. Diluční řada byla vytvořena v programu post PCR ECO Study (Illumina, USA). Byla tvořena vzorky, kde byl zaklonován standard ředěný v negativním DNA vzorku vyizolovaném z broskvoně GF 305. Výsledná koncentrace dilučních bodů na reakci byla od 2×10^7 do 2×10^1 kopií cílového úseku DNA a každý bod diluční řady byl analyzován v triplikátech. Výsledné parametry standardní křivky jsou: %E (efektivita amplifikace) = 97,09; R^2 (korelační koeficient) = 0,998; k (slope) = -3,39. Parametry takto vytvořené standardní křivky jsou dostatečné pro analýzu vzorků s poměrně velkým rozsahem koncentrace patogenu.

Obr. 31 Standardní křivka real-time PCR protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) vytvořená z diluční řady standardu ředěného v negativním vzorku DNA izolované z broskvoně GF 305. Výsledné parametry standardní křivky jsou: %E (efektivita amplifikace) = 97,09; R^2 (korelační koeficient) = 0,998; k (slope) = -3,39.



Vlastní kvantifikace

Nejlepší výsledky absolutní kvantifikace jsou dosažitelné, když jsou v každém běhu real-time PCR použity i standardy pro vytvoření diluční řady. Nové real-time PCR systémy však umožňují v post PCR softwarech normalizovat za použití interních kontrol běhy mezi sebou, a tak vyhodnocovat několik běhů real-time PCR s jednou standardní křivkou. Takto je možné ušetřit náklady na reagentiích i pracovní síle.

Kontaminace a správnost běhu se vyhodnocují analýzou pozitivní kontroly, negativní kontroly i blanku (kontrola bez nukleové kyseliny). Pro relevanci se kontrolní vzorky analyzují v duplikátech v každém běhu. Neznámé vzorky se analyzují vždy alespoň v triplikátech. Standardní odchylka hodnot ct se pohybuje do hodnoty 0,5.

Pokud je tato hodnota vyšší, indikuje problémy s pipetováním, s kvalitou PCR mixu nebo instrumentu. Vyšší odchylky než 0,5 jsou běžné při vzorcích/standardech s velmi nízkými koncentracemi cílového úseku DNA (10^1 až 10^0 kopií. μl^{-1}), kdy stochasticky dochází k nerovnoměrnému odebrání množství DNA pipetou. Testované vzorky, které se nacházejí mimo rozpětí dilučních bodů standardní křivky, jsou vyřazeny kvůli nemožnosti ověřit vlastnosti amplifikace za tímto rozpětím.

Množství kopií cílového úseku DNA ve vzorku vypočtené real-time PCR softwarem na základě standardní křivky však neudává skutečnou koncentraci cílového úseku DNA v původním vzorku. Efektivita amplifikace, množství DNA vložené do reakce, množství elučního pufru, ředění během izolace DNA, hmotnost rostlinného materiálu použitého pro izolaci DNA i počet lokusů cílového úseku DNA ve fytoplazmě jsou faktory, se kterými je nutné počítat při stanovování skutečného množství buněk fytoplazmy v rostlinném pletivu.

Fytoplazmy jsou obligátní parazité vyskytující se ve floému rostlinného pletiva. Separovat buňky fytoplazem z hostitelské rostliny není možné, a proto se v izolované DNA nachází DNA z hostitelského organismu i z fytoplazmy nacházející se v něm. Je proto přirozené vztáhnout množství fytoplazmy na množství jednotek hostitelského organismu. Vzorky je však nutné mezi sebou normalizovat z důvodu různých navážek rostlinné hmoty (ale i množství hmyzích vektorů) mezi vzorky. Normalizace je možná vícero způsoby, od vyjádření kvantity fytoplazem v poměru k množství genomické rostlinné DNA, počtu rostlinných buněk určených kvantifikací single-copy genů (HAN *et al.*, 2007), hmotností navážky rostlinného pletiva až po počet hmyzích vektorů. Pro certifikovanou metodiku bude uveden výpočet pro normalizaci na hmotnost navážky rostlinného pletiva. Je však možné použít kterýkoliv způsob normalizace.

Výpočet:

$$x = \frac{A \times B \times C}{(E - 1) \times D \times 2}$$

x – množství buněk fytoplazmy na gram rostlinného pletiva v původním rostlinném vzorku

- A – množství kopií cílového úseku DNA vzorku v PCR reakci (získáno ze softwaru real-time PCR instrumentu)
- B – poměr celkového objemu vzorku DNA k poměru objemu DNA vloženého do reakce
- C – ředění rostlinného vzorku během izolace DNA
- v protokolu podle MAIXNERA *et al.* (1995) se do konečné izolace použil 1 ml zhomogenizovaného vzorku z celkových 6 ml extrakčního pufu použitého pro homogenizaci. Ředění má hodnotu 6.
 - při použití soupravy DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo) se vzorek během izolace neředí. Ředění má hodnotu 1.
- D – hmotnost rostlinného vzorku použitého pro izolaci DNA v gramech
- E – efektivita amplifikace vypočtená z hodnoty slope po vytvoření standardní křivky
- 2 – v genomu fytoplazem se nachází 16S rRNA gen ve dvou kopiích (DERMASTIA *et al.*, 2017), pro určení počtu buněk fytoplazmy ve vzorku se výsledný počet cílového úseku DNA dělí dvěma.

3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Novost předložené metodiky spočívá především v komplexnosti metodiky jako celku, a to prostřednictvím popisu a optimalizace funkčního metodického postupu počínajícího odběrem vzorků, izolací DNA přes samotnou detekci a kvantifikaci fytoplazem ze skupiny 16 SrX real-time PCR protokolem podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) až po vlastní interpretaci výsledků. Publikovaný protokol bez ověření a určitých optimalizací není v současné laboratorní praxi vždy použitelný. Jako příklad lze uvést protokoly pro detekci fytoplazem metodou LAMP, které jsou v praxi nepoužitelné. Real-time PCR metoda poskytuje vyšší citlivost detekce fytoplazem při nižším riziku kontaminací, a navíc snižuje pracovní čas laboranta na vykonání diagnostiky ve srovnání s nested PCR a PCR/RFLP analýzami. Umožňuje tak kvalitněji a rychleji detekovat cílový organismus. Metodika je primárně zaměřena na popis postupu kvantifikace, která má spíše vědecký význam, ale stejně tak může sloužit i pro vlastní diagnostiku. Po validaci by byla možná detekce i kvantifikace fytoplazem jiných než ze skupiny 16 SrX, jelikož se jedná o univerzální real-time PCR protokol (CHRISTENSEN *et al.*, 2004). Takto celistvý popis postupu od odběru vzorků po diagnostiku/kvantifikaci fytoplazem pomocí real-time PCR v České republice chybí.

Metodika také poskytuje možnost snížení finanční zátěže laboratoří, respektive cenu analýzy diagnostikovaného vzorku. Proti původnímu protokolu podle CHRISTENSEN *et al.* (2004) založeném na reagentiích TaqMan Universal PCR Master Mix (katalogové číslo: 4304437) firmy Applied Biosystems (USA) je v metodice protokol založen na využití reagentií firmy Promega (USA) (popsáno výše), které jsou významně levnější, přičemž další finanční úspora je možná i při využití izolačního protokolu podle MAIXNERA *et al.* (1995) ve srovnání s kolonkovými kity, např. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, DE).

Použitá modifikovaná izolace DNA původně podle MAIXNERA *et al.* (1995), také významně šetří čas pro detekci nebo kvantifikaci vzorku. Izolace DNA popsaná v předložené metodice umožňuje získat dostatečně kvalitní DNA z pletiv v kratším čase než běžný postup podle AHRENSE a SEEMÜLLERA (1992) i včetně extrakčních kitů. Popsaný postup umožňuje získat jedním pracovníkem za

standardního vybavení laboratoře finální DNA z 50 vzorků během pracovní směny (8 hodin).

Autoři se domnívají, že předložená metodika, ačkoliv nepřináší revoluční změny v původním zahraničním protokolu, představuje komplexní a zejména funkční metodický postup kvantifikace vzorků pro všechny tři v ČR významné fytoplazmy, který je navíc publikačně ověřený v mnoha analýzách v rámci řešení výzkumných projektů a disertačních prací.

4 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika je určena zejména pro výzkumná a šlechtitelská pracoviště zabírající se studiem vzájemných interakcí hostitele a fytoplazmy, respektive studiem odolnosti genotypů k infekci popisovanými fytoplazmami. Další skupinou, která může metodiku uplatnit, jsou šlechtitelé ovocných odrůd při hodnocení reakcí inokulovaných genotypů s inokulem při tzv. fenotypizaci. Poznání koncentrace patogenu v jednotlivých částech ovocného stromu, jako jsou podnož a ušlechtilá část, mohou pomoci definovat míru citlivosti nebo odolnosti, respektive jejich rozdíly.

V poslední řadě je možné metodiku využít na pracovištích zabírajících se rutinní diagnostikou škodlivých organismů, jakou jsou laboratoře ÚKZÚZ či v jiné akreditované nebo pověřené laboratoři. V rámci vyšetřování různých vzorků může zejména ve sporných případech hrát znalost koncentrace fytoplazmy ve vzorku významnou roli. Metodiku lze využít i v rámci výzkumných a pedagogických aktivit na univerzitních pracovištích.

Metodika bude dostupná v omezeném počtu v tištěné verzi a také na webu Zahradnické fakulty v Lednici, MENDELU v Brně v elektronické pdf. verzi na webové adrese: <http://zf.mendelu.cz/28199-metodiky>.

Obr. 32 Horní řada listů – typické červenání listů charakteristické pro asijské slivoně infikované fytoplazmou ESFY, dolní řada listy ze zdravého stromu *P. salicina* Lindley.



Obr. 33 Předčasné vybarvování meruněk v důsledku infekce fytoplazmou ESFY.



5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení metodiky do praxe lze rozdělit na dvě skupiny nákladů. První skupinou jsou náklady na technické vybavení, které představuje investiční náklady v hodnotě do 1 mil. Kč. Jedná se o náklady na chlazenou centrifugu v úrovni \pm 300 tis. Kč, laminární box 100 tis. Kč., DNA koncentrátor 200 tis. Kč. a real-time PCR termocykler 350 tis. Kč. Oproti klasické PCR (nested PCR) odpadají náklady na transiluminátor a elektroforézu. Na druhé straně investice do real-time PCR cyklu je jen o něco vyšší než do kvalitního gradientového termocyklu. Druhou skupinou jsou materiálové náklady zahrnující nezbytný spotřební materiál. Náklady na materiál jsou závislé na způsobu použití metody. Pro rutinní diagnostiku pomocí zaběhnuté real-time PCR jsou náklady na 1 vzorek nižší než u klasické PCR (do 400 Kč u real-time PCR, nad 600 Kč u nested PCR). V případě následné kvantifikace vzorků je potřebné náklady navýšit o nezbytný standard DNA, jehož cena se pohybuje od 15 tis. Kč za diluční řadu a repetice vzorku.

Fytoplazmy ovocných dřevin jsou stále závažné patogeny způsobující každoročně vysoké ekonomické ztráty zejména ve výsadbách meruněk, broskvoní a hrušní. Ve výsadbách meruněk dochází v závislosti na odrůdách a vegetačním průběhu daného roku až k 30% úhynu stromů. Při průměrné velkoobchodní ceně s daní a licenčními poplatky ve výši 150 Kč/stromek mohou ztráty způsobené neustálou dosadbou dosahovat 45 tis. Kč/ha/rok. U hrušní a jabloní jsou významné ztráty zejména na výnosu a kvalitě plodů. Kvalita hrušek je nižší, plody jsou menší, často deformované, méně šťavnaté a kaménčité. U jabloní jsou plody z nemocných stromů podstatně menší, méně vybarvené a také je celkově nižší výnos. Přesné údaje samozřejmě nelze kvantifikovat, neboť promořenost a sklizeň ze zasažených výsadeb se nesledují. V zahraničních zdrojích se uvádí běžné ztráty na úrovni 10–20 % a ve výjimečných případech až 80–90 % (CAPINERA, 2008). Bude-li se vycházet z principu, že průměrný výnos jablek v intenzivních výsadbách v ČR dosahoval 14,59 t/ha za rok 2017 a je zatížen průměrně 15% ztrátou pod vlivem onemocnění způsobeným fytoplazmou, je na výnosu 2,2 t/ha a při ceně 11 414 Kč/t jablek ztráta z každého hektaru zhruba 25 100 Kč.

U hrušní pak ztráta dosahuje při průměrném výnosu 6,8 t/ha a při ceně 15 379 Kč/t hrušek hodnoty 1,02 t/ha a ekonomicky 15 700 Kč/t. Při celkových plochách výsadeb produkčních sadů jabloní a hrušní ve výši 7 600 ha dosahují ztráty v ČR až 184 mil. Kč.

V současné době neexistují relevantní donory odolnosti (rezistence/tolerance) k fytoplazmám. Statut citlivosti/odolnosti většiny komerčních i krajových odrůd k nákaze fytoplazmami je neznámý. Vzhledem k závažnosti těchto onemocnění je nezbytné věnovat zvýšené úsilí průzkumu odrůdového sortimentu a hledání donorů odolnosti. Využití metodiky při šlechtění ovocných druhů podléhajících infekci fytoplazmami může významně zkrátit dobu testování a omezit chyby vzniklé při interpretaci výsledků fenotypizace.

Přínosy uživatelům spočívají jednak ve snížení nákladů na analýzu vzorků metodou real-time PCR, a jednak ve větší přesnosti této metody. Oproti nested PCR je riziko falešně (negativně/pozitivně) detekovaných vzorků minimální. Přínosy uživatelům jsou závislé na způsobu použití metodiky (detekce/kvantifikace) a na okruhu činností, pro které je použita (šlechtění, výzkum, diagnostika v rámci certifikačního schématu apod.). Kvantifikovat přesněji finanční ukazatele je tak ale poměrně zavádějící.

6 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- AHRENS, U., SEEMÜLLER, E., 1992: Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828–832. DOI: 10.1094/Phyto-82-828.
- AHRENS, U., LORENZ, K. H., SEEMÜLLER, E., 1993: Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(6): 686–691.
- ANDERSEN, M. T., LIEFTING, L. W., HAVUKKALA, I., BEEVER, R. E., 2013: Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus Phytoplasma australiense*' reveals genome plasticity. *BMC Genomics*, 14: 529.
- ANONYM, 2017: PM 7/62 (2) '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Ca. P. pyri*' and '*Ca. P. prunorum*'. *EPP0 Bull*, 47: 146–163.
- AROCHA, Y., LOPEZ, M., PINOL, B., FERNANDEZ, M., PICORNELL, B., ALMEIDA, R., PALENZUELA, I., WILSON, M. R., JONES, P., 2005: '*Candidatus Phytoplasma graminis*' and '*Candidatus Phytoplasma caricae*', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6): 2451–2463.
- BAI, X., ZHANG, J., EWING, A., MILLER, S. A., RADEK, A. J., SHEVCHENKO, D. V., TSUKERMAN, K., WALUNAS, T., LAPIDUS, A., CAMPBELL, J. W., HOGENHOUT, S. A., 2006: Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- BARBARA, D. J., MORTON, A., CLARK, M. F., DAVIES, D. L., 2001: Molecular variation in immunodominant membrane proteins from phytoplasmas. *Acta Horticulturae*, 550: 405–408.
- BARBARA, D. J., MORTON, A., CLARK, M. F., DAVIES, D. L., 2002: Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorotic aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*, 148: 157–167.
- BATJER, L., SCHNEIDER, H., 1960: Relation of pear decline to rootstocks and sieve-tube necrosis. In: *Proceedings. American Society for Horticultural Science*, 76: 85–97.

- BERG, M., DAVIES, D. L., CLARK, M. F., VETTEN, J., MAIER G., SEEMÜLLER, E., 1999: Isolation of a gene encoding an immunodominant membrane protein gene in the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*, 145: 1937–1943.
- BERG, M., MELCHER, U., FLETCHER, J., 2001: Characterization of spiroplasma citri adhesion related protein SARP1, which contains a domain of a novel family designated sarpin. *Gene*, 275(1): 57–64.
- BERG, M., DAVIES, D. L., CLARK, M. F., VETTEN, H. J., MAIER, G., MARCONE, C., SEEMULLER, E., 1999: Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*, 145 (8): 1937–1943.
- BERTACCINI, A., 2007: Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontieres in Bioscience*, 12: 673–689.
- BERTACCINI, A., DUDUK, B., PALTRINIERI, S., CONTALDO, N., 2014: Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1763–1788.
- BLATTNÝ, C., BLATTNÝ, C., 1960: A contribution to the question of the group appurtenance of the virus proliferation of apples. *Folia microbiologia*, 5: 336–342.
- BLODGETT, E. C., WOODBRIDGE G. G., BENSON, N., O'NEILL, W. J. 1955: Report of pear decline committee. *Proceedings of Washington State Horticultural Association*, 51: 231–33.
- BLODGETT, E. C., SCHNEIDER, H., AICHELE, M. D., 1962: Behavior of pear decline disease on different stock-scion combinations. *Phytopathology*, 52: 679–84.
- BLOMQUIST, C. L., KIRKPATRICK, B. C., 2002: Identification of phytoplasma taxa and insect vectors of peach yellow leaf roll disease in California. *Plant Disease*, 86 (7): 759–763.
- BONNET, F., SAILLARD, C., KOLLAR, A., SEEMÜLLER, E., BOVÉ, J. M., 1990: Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3: 438–443.
- BUSTIN, S. A., ZACCARA, S., NOLAN, T., 2012: An introduction to the real-time polymerase chain reaction. *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*.

- CAPINERA, J. L., 2008: Encyclopedia of Entomology. Springer-Verlag New York Inc. S. 4346, ISBN-13: 978-1402062421.
- CARRARO, L., FERRINI, F., ERMACORA, P., LOI, N., 2002: Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology*, 51(4): 513–517.
- CARRARO, L., ERMACORA, P., LOI, N., OSLER, R., 2004: The recovery phenomenon in apple proliferation-infected trees. *Journal of Plant Pathology*, 86: 141–146.
- DAVIS, R. E., DALLY, E. L., GUNDERSEN, D. E., LEE, I. M., HABILI, N., 1997: ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2): 262–269.
- DAVIS, R. E., SINCLAIR, W. A., 1998: Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88 (12): 1372–1376.
- DENG, S., HIRUKI, C., 1991: Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable *Mollicutes*. *J. Microbiol. Methods*, 14: 53–61.
- DERMASTIA, M., BERTACCINI, A., CONSTABLE, F., MEHLE, N., 2017: Grapevine yellows diseases and their phytoplasma agents: Biology and detection. Springer.
- DICKINSON, M., TUFFEN, M., HODGETTS, J., 2013: The phytoplasmas: an introduction. In: *Phytoplasma: 1–14*. Humana Press, Totowa, NJ.
- DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K., ASUYAMA, H., 1967: Mycoplasma- or PLT group-like microorganism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches’ broom, aster yellows, or paulownia witches’ broom. *Ann Phytopathol. Soc. Jpn.*, 33: 259–266.
- EISENBERG, E., LEVANON, E. Y., 2013: Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29.10: 569–574.
- EPPO/CABI, 1996a: Apple proliferation phytoplasma. In: *Quarantine pests for Europe. 2. vydání* (ed.) Smith, I. M.; McNamara, D. G.; Scott, P. R.; Holderness, M. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- EPPO/CABI, 1996b: Apricot chlorotic leafroll phytoplasma. In: *Quarantine pests for Europe. 2. vydání* (ed.) Smith, I. M.; McNamara, D. G.; Scott, P. R.; Holderness, M. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- EPPO PM 4/27, 1999: Certification scheme for pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. *EPPO Bulletin*, 29: 239–252.

- EPPO PM 4/30, 2001: Schemes for the production of healthy plants for planting. Certification scheme for almond, apricot, peach and plum, EPPO Bull., 31: 463–78.
- EPPO PM 7/62 (1) 2006: EPPO Standards *Candidatus* Phytoplasma mali. EPPO Bulletin, 36: 121–126.
- EPPO PM 7/62 (2) 2017: ‘*Candidatus* P. mali’, ‘*Ca.* P. pyri’ and ‘*Ca.* P. prunorum’. EPPO Bull., 47: 146–163.
- FIALOVÁ, R., NAVRÁTIL, M., VÁLOVÁ, P., 2003: Phytoplasma occurrence in apple trees in the Czech Republic. Plant Protect. Sci., 39(1): 7–12.
- FIRRAO, G., GOBBI, E., LOCCI, R. 1993: Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. Phytopathology, 83: 602–607.
- FIRRAO, G., CARRARO, L., GOBBI, E., LOCCI, R., 1996a: Molecular characterization of a phytoplasma causing phyllody in clover and other herbaceous hosts in northern Italy. Eur J Plant Pathol, 102: 817–822.
- FIRRAO, G., SMART, C. D., KIRKPATRICK, B. C., 1996b: Physical map of the western X-disease phytoplasma chromosome. J Bacteriol, 178: 3985–3988.
- FIRRAO, G., GIBB, K., STRETEN, C., 2005: Short taxonomic guide to the genus ‘*Candidatus* Phytoplasma’. Journal of Plant Pathology, 249–263.
- FLORENCE, E. R., CAMERON, H. R., 1978: Three-dimensional structure and morphology of mycoplasma-like bodies associated with albino disease of *Prunus avium*. Phytopathology, 68: 75–80.
- GARCIA-CHAPA, M., MEDINA, V., VIRUEL, M. A., LAVINA, A., BATLLE, A., 2003: Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested PCR in different pear cultivars. Plant Pathology, 52 (4): 513–520.
- GENTILI, P., CORNAGGIA, D., DESVIGNES, J. C. 1998: Identification and comparison of different *Prunus* phytoplasma diseases by indexing on GF305 peach seedlings in the greenhouse. Acta Horticulturae, 472: 723–729.
- GOIDANICH, G., 1933: Un deperimento dei susini. Boll. Stn. Patol Veg. Roma, 13: 160–173.
- GRIFFITHS, H. M., SINCLAIR, W. A., SMART, C. D., DAVIS, R. E., 1999: The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches’ broom: ‘*Candidatus* Phytoplasma fraxini’. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49(4): 1605–1614.

- GUNDERSEN, D. E., LEE, I.-M., 1996: Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers. *Phytopathol. Mediterr.*, 35: 144–151.
- HACKETT, K. J., CLARK, T. B., 1989: The ecology of spiroplasmas. 113–199. In: Whitcomb, R. F., Tully, J. G. (ed.), *The mycoplasmas*, 5. Academic Press, Inc., New York.
- HAN, Y., GASIC, K., SUN, F., XU, M., KORBAN, S. S., 2007: A gene encoding starch branching enzyme I (SBEI) in apple (*Malus × domestica*, *Rosaceae*) and its phylogenetic relationship to Sbe genes from other angiosperms. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43.3: 852–863.
- HIRUKI, C., WANG, K., 2004: Clover proliferation phytoplasma: '*Candidatus* *Phytoplasma trifolii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1349–1353.
- HOGENHOUT, S. A., AMMAR, E. D., WHITFIELDS, A. E., REDINBAUGH, M. G., 2008: Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46: 327–359.
- CHABROLIN, C., 1924: Quelques maladies des arbres fruitiers de la Vallée du Rhône. *Annales des Epiphyties*, 10: 265–333.
- CHRISTENSEN, N. M., NICOLAISEN, M., HANSEN, M., SCHULZ, A., 2004: Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol.Plant-Mic. Interactions*, 17.11: 1175–1184.
- CHRISTENSEN, N. M., AXELSEN, K. B., NICOLAISEN, M., SCHULZ, A., 2005: Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in Plant Science*, 10(11): 526–535.
- IIDA, T., 1972: Discovery of a plant pathogenic mycoplasma. *Plant Prot.*, 26: 175–176.
- IRPCM. Phytoplasma/Spiroplasma Working Team Phytoplasma Taxonomy Group, 2004: '*Candidatus* *Phytoplasma*', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1243–1255.
- ISHIIE, T., DOI, Y., YORA, K., ASUYAMA, H., 1967: Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Japanese Journal of Phytopathology*, 33(4): 267–275.

- JARAUSCH, W., SAILLARD, C., DOSBA, F., BOVÉ, J. M., 1994a: Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl Environ Microbiol*, 60: 2916–2923.
- JARAUSCH, W., LANSAC, M., SILARD, C., BROQUAIRE, J. M., DOSBA, F., 1998: PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasma and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 17–27.
- JARAUSCH, W., LANSAC, M., DOSBA, F., 1999a: Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *J. of Phytopathology*, 147: 47–54.
- JARAUSCH, W., LANSAC, M., BLIOT, C., DOSBA, F., 1999b: Phytoplasma transmission by *in vitro* graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant Pathology*, 48: 283–287.
- JARAUSCH, W., SAILLARD, C., BROQUAIRE, J. M., GARNIER, M., DOSBA, F., 2000a: PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Molecular and Cellular Probes*, 14, ISSN: 0890-8508, 171–179.
- JARAUSCH, W., PECCERELLA, T., SCHWIND, N., JARAUSCH, B., KRCZAL, G., 2003: Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. In: XIX International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases, 657: 415–420.
- JARAUSCH, B., FUCHS, A., MÜHLENZ, I., LAMPE, I., HARZER, U., JARAUSCH, W., 2007: Research on European stone fruit yellows (ESFY) in Germany. *Bulletin of insectology*, 60(2): 389–390.
- JARAUSCH, B., MÜHLENZ, I., BECK, A., LAMPE, I., HARZER, U., JARAUSCH, W., 2008: Epidemiology of European stone fruit yellows in Germany. *Acta Horticulturae*, 781: 417–422.
- JOMANTIENE, R., MAAS, J. L., TAKEDA, F., DAVIS, R. E., 2002: Molecular Identification and classification of strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup. *Plant Disease*, 86: 920.
- JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., MIYATA, S. I., OSHIMA, K., UGAKI, M., LEE, J. T., HIBI, T., NAMBA, S., 2002: '*Candidatus*

- Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. *Int. Jour. of Syst. and Evol. Micro.*, 52(5): 1543–1549.
- JUNG, H. Y., SAWAYANAGI, T., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., WEI, W., OSHIMA, K., MIYATA, S.-I., UGAKI, M., HIBI, T., NAMBA, S., 2003: 'Candidatus Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches' broom disease. *Int. Jour. of Syst. and Evol. Micro.*, 53(4): 1037–1041.
- KAMIŃSKA, M., SILWA, H., 2003: Effect of antibiotics on the symptoms of stunting disease of *Magnolia liliiflora* plants. *Journal of Phytopathology*, 151: 59–63.
- KIRKPATRICK, B. C. 1992: Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens: 4050–4067. In: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. aSchleifer, K. H. (ed.), *The prokaryotes*, 2. vydání, Springer-Verlag, New York.
- KISON, H., SCHNEIDER, B., SEEMÜLLER, E., 1994: Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasmalike organism. *Journal of Phytopathology*, 141: 395–401.
- KISON, H., KIRKPATRICK, B. C., SEEMÜLLER, E., 1997: Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. *Plant Pathology*, 46: 538–544.
- KISON, H., SEEMÜLLER, E., 2001: Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen, *J. Phytopathology*, 149: 533–541, ISSN 0931-1785.
- KISS, T., NECAS, T., NECASOVA, J., 2016: Comparison of real-time PCR protocols in detection and quantification of fruit tree 16 SrX group phytoplasmas. *Genetika*, 48 (2): 629–642.
- KUBE, M., SCHNEIDER, B., REINHARDT, R., SEEMÜLLER, E., 2007: First look into the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma mali' in comparison to 'Candidatus Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 113–114.
- KUBE, M., SCHNEIDER, B., KUHL, H., DANDEKAR, T., HEITMANN, K., MIGDOLL, A. M., REINHARDT, R., SEEMÜLLER, E., 2008: The linear chromosome of the plant pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics*, 9.

- KUNKEL, L. O., 1926: Studies on aster yellows. *Am J Bot*, 23: 646–705.
- KUNZE, L., 1989: Apple proliferation. Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, Pullmann, USA. 99–113.
- KUSKE, C. R., KIRKPATRICK, B. C., 1992: Distribution and multiplication of western aster yellows mycoplasmalike organism in *Catharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. *Phytopathology*, 82(4): 457–462.
- LAIMER, M., BERTACCINI, A., 2008: European Stone fruit yellows. In: HARRISON, N. A., *at al.*, Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas. Studium Press LLC, ISBN 1-933699-30-2.
- LAUER, U., SEEMÜLLER, E., 2000: Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. *Journal of bacteriology*, 182(5): 1415–1418.
- LEDERER, M., SEEMÜLLER, E., 1992: Demonstration of mycoplasmas in *Prunus* species in Germany. *Journal of Phytopathology*, 134: 89–96
- LEE, I.-M., DAVIS, R. E., 1992: Mycoplasmas which infect plants and insects. In: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (Maniloff, J., Mc Elhansey, R. N, Finch, L. R. a Baseman, J.B.(ed.): 379–390.
- LEE, I.-M., DAVIS, R. E., SINCLAIR, W. A., DEWITT, N. D., CONTI, M., 1993a: Genetic relatedness of mycoplasmalike organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology*, 83: 829–833.
- LEE, I.-M., HAMMOND, R. W., DAVIS, R. E., GUNDERSEN, D. E., 1993b: Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology*, 83: 834–842.
- LEE, I.-M., BERTACCINI, A., VIBIO, M., GUNDERSEN, D. E., 1995: Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 85(6): 728–735.
- LEE, I.-M., DAVIS, R. E., GUNDERSEN-RINDAL, D. E., 2000: Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Reviews in Microbiology*, 54.1: 221–255.
- LEE, I.-M., GUNDERSEN-RINDAL, D., DAVIS, R. E., BOTTFNER, K. D., MARCONE, C., SEEMÜLLER, E., 2004a: ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’,

- a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 1037–1048.
- LEE, I.-M., MARTINI, M., MARCONE, C., ZHU, S. F., 2004b: Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 337–47.
- LEE, I.-M., BOTTFNER, K. D., SECOR, G., RIVERA-VARAS, V., 2006: ‘*Candidatus Phytoplasma americanum*’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7): 1593–1597.
- LEE, I.-M., BOTTFNER-PARKER, K. D., ZHAO, Y., DAVIS, R. E., HARRISON, N. A., 2010: Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12): 2887–2897.
- LEE, I.-M., BOTTFNER-PARKER, K. D., ZHAO, Y., BERTACCINI, A., DAVIS, R. E., 2012: Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches’ broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9): 2279–2285.
- LEFOL, C., CAUDWELL, A., LHERMINIER, J., LARRUE, J., 1993: Attachment of the flavescence dorée pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of applied biology*, 123(3): 611–622.
- LIEFTING, L. W., ANDERSEN, M. T., BEEVER, R. E., GARDNER, R. C., FORSTER, R. L., 1996: Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3133–3139.
- LIM, P. O., SEARS, B. B., 1989: 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 171(11): 5901–5906.
- LIM, P. O., SEARS, B. B., 1991: The genome size of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism resembles those of animal mycoplasmas. *Journal of bacteriology*, 173(6): 2128–2130.
- LIM, P. O., SEARS, B. B., 1992: Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organisms and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. of Bacter.*, 174: 2606–2611.

- LIU, H. L., CHEN, C. C., LIN, C. P., 2007: Detection and identification of the phytoplasma associated with pear decline in Taiwan. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 281–291
- LOI, N., CARRARO, L., MUSETTI, R., FIRRAO, G., OSLER, R., 1995: Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. *Journal of Phytopathology*, 143: 581–584.
- LOI, N., ERMACORA, P., CARRARO, L., OSLER, R., CHEN, T. A., 2002: Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *Eur J Plant Pathol*, 108: 81–86.
- LORENZ, K.-H., DOSBA, F., POGGI POLLINI, C., LLÁCER, G., SEEMÜLLER, E., 1994: Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 101: 567–575.
- LORENZ, K.-H., SCHNEIDER, B., AHRENS, U., SEEMÜLLER, E., 1995: Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85.7: 771–776.
- MAIXNER, M., AHRENS, U., SEEMÜLLER, E., 1995: Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, 101.3: 241–250.
- MARAMOROSCH, K., RAYCHAUDHURI, S. P., 1988: *Mycoplasma diseases of crop, basic and applied aspects*. Springer-Verlag, New York, ISBN 13-978-1-4612-8360-7: 350–351.
- MARAMOROSCH, K., 2011: Historical reminiscences of phytoplasma discovery. *Bulletin of Insectology*, 64: S5–S8.
- MARCONI, C., RAGOZZINO, A., FIRRAO, G., and LOCCI, R. 1994: Detection of a rubus stunt isolate and characterization by RFLP analysis. *Rivista di Patologia Vegetale* 4, 47–58.
- MARCONI, C., RAGOZZINO, A., SEEMÜLLER, E., 1996: European stone fruit yellows phytoplasma as the cause of peach vein enlargement and other yellows and decline diseases of stone fruits in southern Italy. *Journal of Phytopathology*, 144(11–12): 559–564.
- MARCONI, C., RAGOZZINO, A., SEEMÜLLER, E., 1997: Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). *European Journal of Forest Pathology*, 27(6): 347–350.

- MARCONI, C., NEIMARK, H., RAGOZZINO, A., LAUER, U., SEEMÜLLER, E., 1999: Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89(9): 805–10.
- MARCONI, C., SEEMÜLLER, E., 2001: A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology*, 147(5): 1213–1221.
- MARCONI, C., SCHNEIDER, B., SEEMÜLLER, E., 2004a: ‘*Candidatus Phytoplasma cynodontis*’, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1077–1082.
- MARCONI, C., GIBB, K. S., STREITEN, C., SCHNEIDER, B., 2004b: ‘*Candidatus Phytoplasma spartii*’, ‘*Candidatus Phytoplasma rhamnii*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*’, respectively associated with spartium witches’ broom, buckthorn witches’ broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1025–1029.
- MARTINI, M., LEE I.-M., BOTTNER, K. D., ZHAO, Y., BOTTI, S., BERTACCINI, A., HARRISON, N. A., CARRARO, L., MARCONI, C., KHAN, A. J., OSLER, R., 2007: Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2037–2051.
- MASZKIEWICZ, J., BLASZCZAK, W., MILLIKAN, D. F., 1980: Changes in phloridzin content and osmotic value of cellular sap and cell wall thickness of apples leaf tissue associated with the proliferation disease. *Phytopath. Z.*, 99: 33–36.
- MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, B., NEČAS, T., 2009: Comparison of Methods of Isolating DNA for ESFY Phytoplasma Detection. *Acta Horticulturae*, 825: 213–220.
- MCCOY, R. E., CAUDWELL, A., CHANG, C. J., CHEN, T. A., CHIYKOWSKI, L. N., COUSIN, M.-T., DALE, J. L., DE LEEUW, G. T. N., GOLINO, D. A., HACKETT, K. J., KIRKPATRICK, B. C., MARWITZ, R., PETZOLD, H., SINHA, R. C., SUGIURA, M., WHITCOMB, R. F., YANG, I. L., ZHU, B. M., SEEMÜLLER, E., 1989: Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms: 487–640. In: *The Mycoplasmas (Vol. V)*: Whitcomb, R. F. a Tully, J. G. (ed.) Academic Press, San Diego, USA.
- MCINTYRE, J., DODDS, A., WALTON, G. S., LACY, G. H., 1978: Declining pear trees in Connecticut: Symptoms, distribution, symptom remission by oxytetracycline, and associated mycoplasma-like organisms. *Plant Disease Reports*, 62: 503–07.

- McLARTY, H. R., 1948: Killing of pear trees. *Ann Rep Canad Plant Dis Surv*, 28: 77.
- MITROVIĆ, J., KAKIZAWA, S., DUDUK, B., OSHIMA, K., NAMBA, S., BERTACCINI, A., 2011: The groEL gene as an additional marker for finer differentiation of '*Candidatus Phytoplasma asteris*'-related strains. *Annals of Applied Biology*, 159(1): 41–48.
- MONTANO, H. G., DAVIS, R. E., DALLY, E. L., HOGENHOUT, S., PIMENTEL, J. P., BRIOSO, P. S., 2001: '*Candidatus Phytoplasma brasiliense*', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3): 1109–1118.
- MORTON, A., DAVIES, D. L., BLOMQUIST, C. L., BARBARA, D. J., 2003: Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology*, 4: 109–114.
- NAMBA, S., KATO, S., IWANAMI, S., OYAIZU, H., SHIOZAWA, H., TSUCHIZAKI, T., 1993: Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83(7): 786–791.
- NAMBA, S., OYAIZU, H., KATO, S., IWANAMI, S., TSUCHIZAKI, T., 1993: Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int J Syst Bacteriol*, 43: 461–467.
- NAVRÁTIL, M., VÁLOVÁ, P., ŠAFAŘOVÁ, D., NEČAS, T., KRŠKA, B., POLÁK, J., KUMAR, J., SUCHÁ, J., LUDVÍKOVÁ, J. (2009): Metodika detekce a identifikace karanténních fytoplazmy ovocných dřevin. http://www.lmbm.upol.cz/doc/fyto_FLOovocnychdrevin.pdf
- NEČAS, T., KRŠKA, B., 2005: Detection of *Phytoplasma ESFY* in Apricot Trees using Phloem and Petioles. *Plant protection science*, 41 (4): 132–140.
- NEČAS, T., KRŠKA, B., MAŠKOVÁ, V., ADAM, M., 2008: Influence of the time of sampling on detection of *ESFY phytoplasma*. *Acta Horticulturae*, 781: 435–441.
- NEČASOVÁ, J., NEČAS, T., EICHMEIER, A. and KRŠKA, B. 2016: Use of real-time PCR for the characterization of variable symptoms in *ESFY phytoplasma* disease. *Acta Horticulturae*, 1110: 57–62.
- NEČAS, T., 2019 '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' závažný patogen teplomilných peckovin. Habilitační práce, ZF MENDELU v Brně.

- NÉMETH, M., 1986: Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff Publishers, the Netherlands and Akademia Kiado, Budapešť, Maďarsko: 840, ISBN 9630541939.
- NICHOLS, C. W., SHALLA, T. A., 1960a: Pear decline disease and its apparent southward spread along the Pacific coast of North America. Plant Protection Bulletin, FAO, 9: 39–42.
- NICHOLS, C. W., SCHNEIDER, H., O'REILLY, H. J., SHALLA, T. A., GRIGGS, W. H., 1960b: Pear decline in California. Bull. Calif. Dept. Agric., 49: 186–192.
- NIKOLIĆ, P., MEHLE, N., GRUDEN, K., RAVNIKAR, M., DERMASTIA, M., 2010: A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. Molecular and cellular probes, 24.5: 303–309.
- OKUDA, S., 1972: Occurrence of diseases caused by mycoplasma-like organisms in Japan. Plant Prot, 26: 180–183.
- OSHIMA, K., KAKIZAWA, S., NISHIGAWA, H., JUNG, H.-Y., WEI, W., SUZUKI, S., ARASHIDA, R., NAKATA, D., MIYATA, S., UGAKI, M., NAMBA, S., 2004: Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nature Genetics, 36: 27–29.
- ORGÁSOVÁ, H., BŘEZÍKOVÁ, M., SCHLESINGEROVÁ, G., 2011: Presence of phytoplasmas in *hemipterans* in Czech vineyards. Bulletin of Insectology, 64: S119–S120.
- PADOVAN, A. C., GIBB, K. S., BERTACCINI, A., VIBIO, M., BONFIGLIOLI, R. E., MAGAREY, P. A., SEARS, B. B., 1995: Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. Australian Journal of Grape and Wine Research, 1(1): 25–31.
- PADOVAN, A., GIBB, K., PERSLEY, D., 2000: Association of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' with green petal and lethal yellows diseases in strawberry. Plant Pathol., 49: 362–369.
- PFÄFFL, M. W., 2012: Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction. Quantitative real-time PCR. Appl. Microbiol., 53–62.
- PFÄFFL, M. W., TICHOPÁD, A., PRGIMET, C., NEUVIANS, T. P., 2004: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology letters, 26.6: 509–515.
- PŘIBYLOVÁ, J., ŠPAK, J., 2013: Dodder transmission of phytoplasmas. Methods Mol. Biol., 938: 41–46.

- RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y., 1998: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4): 1094–1156.
- RUI, D., CIFERRI, R., REFATTI, E., 1950: La virosi degli „scopazzi del melo“ nel Veronese. *Notiziario delle Malattie delle Piante*, 13: 7–11.
- SAWAYANAGI, T., HORIKOSHI, N., KANEHIRA, T., SHINOHARA, M., BERTACCINI, A., COUSIN, M. T., HIRUKI, CH., NAMBA, S., 1999: ‘*Candidatus Phytoplasma japonicum*’, a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3): 1275–1285.
- SCHAPER, U., SEEMÜLLER, E., 1982: Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*, 72: 736–742.
- SCHAPER, U., SEEMÜLLER, E., 1984: Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring. *Zeitschrift für Pflanzkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 608–613.
- SCHNEIDER, B., AHRENS, U., KIRKPATRICK, B. C., SEEMÜLLER, E., 1993: Classification of plantpathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139: 519–527.
- SCHNEIDER, B., GIBB, K. S., 1997: Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143(10): 3381–3389.
- SCHNEIDER, B., TORRES, E., MARTÍN, M. P., SCHRÖDER, M., BEHNKE, H. D., SEEMÜLLER, E., 2005: ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1): 303–307.
- SEEMÜLLER, E., KUNZE, L., SCHAPER, U., 1984a: Colonization behavior of MLO, and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 525–532.
- SEEMÜLLER, E., SCHAPER, U., ZIMBELMANN, F., 1984b: Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91: 371–382.

- SEEMÜLLER, E., 1992: Pear decline. In: Kumar, J., Singh, U. S., Mukhopadhyay A. N., Chaube, H. S. (eds.). *Plant Diseases of International Importance: Diseases of Fruit Crops*: 308–334. Englewood Cliffs, USA.
- SEEMÜLLER, E., SCHNEIDER, B., MÄURER, R., AHRENS, U., DAIRE, X., KISON, H., LORENZ, K. H., FIRRAO, G., AVINENT, L., SEARS, B. B., STACKEBRANDT, E., 1994: Phylogenetic classification of phytopathogenic *Mollicutes* by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3): 440–446.
- SEEMÜLLER, E., FOSTER, A., 1995: European stone fruit yellows. In: Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., Uyemoto, J. K. (ed.). *Compendium of Stone Fruit Diseases*: 59–60. APS Press, USA.
- SEEMÜLLER, E., KISON, H., LORENZ, K. H., SCHNEIDER, B., MARCONE, C., SMART, C. D., KIRKPATRICK, B. C., 1998a: Detection and identification of fruit tree phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. In: COST, 56–66.
- SEEMÜLLER, E., STOLZ, H., KISON, H., 1998b: Persistence of the European stone fruit yellows phytoplasma in aerial parts of *Prunus* taxa during the dormant season. *J. Phytopathology*, 146: 407–410.
- SEEMÜLLER, E., SCHNEIDER, B., 2004: ‘Candidatus Phytoplasma mali’, ‘Candidatus Phytoplasma pyri’, ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Mikrobiology*, 54: 1217–1226.
- SEEMÜLLER, E., HARRIES, H., 2010: Plant resistance. In: WEINTRAUB, PH. G., JONES, PH., *Phytoplasmas – genomes, plant hosts and vectors*. CAB International:147–170. ISBN-13: 9781845935306.
- SIDDQUIE, A. B. M., GUTHRIE, J. N., WALSH, K. B., WHITE, D. T., SCOTT, P. T., 1998: Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease*, 82(10): 1112–1120.
- SMART, C. D., SCHNEIDER, B., BLOMQUIST, C. L., GUERRA, L. J., HARRISON, N. A., AHRENS, U., LORENZ, K. H., SEEMULLER, E., KIRKPATRICK, B. C., 1996: Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol*, 62: 2988–2993
- THÉBAUD, G., SAUVION, N., CHADOEUF, J., DUFILS, A., LABONNE, G., 2006: Identifying risk factors for European stone fruit yellows from a survey. *Phytopathology*, 96: 890–899.

- TORRES, E., BERTOLINI, E., CAMBRA, M., MONTON, C., MARTIN, M. P., 2005: Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes*, 19.5: 334–340.
- TOTH, K. F., HARRISON, N., SEARS, B. B., 1994: Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(1): 119–124.
- TRAN-NGUYEN, L. T., KUBE, M., SCHNEIDER, B., REINHARDT, R., GIBB, K. S., 2008: Comparative genome analysis of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ (subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology*, 190(11): 3979–3991.
- VALIUNAS, D., STANIULIS, J., DAVIS, R. E., 2006: ‘*Candidatus* Phytoplasma fragariae’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria* × *ananassa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(1): 277–281.
- VERDIN, E., SALAR, P., DANET, J. L., CHOUEIRI, E., JREIJIRI, F. E., ZAMMAR, S., GÉLIE, B., BOVÉ, J. M., GARNIER, M., 2003: ‘*Candidatus* phytoplasma phoenicium’ sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53(3): 833–838.
- WATERS, H., HUNT, P., 1980: The in vivo three-dimensional form of a plant mycoplasma-like organism by the analysis of serial ultrathin sections. *Microbiology*, 116(1): 111–131.
- WEI, W., KAKIZAWA, S., SUZUKI, S., JUNG, H. Y., NISHIGAWA, H., MIYATA, S. I., OSHIMA, K., UGAKI, M., HIBI, T., NAMBA, S., 2004: In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*, 94(3): 244–250.
- WEISBURG, W. G., TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T. G., VAN ETTEN, J., MANILOFF, J., WOESE, C. R., 1989: A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of bacteriology*, 171(12): 6455–6467.
- WHITCOMB, R. F., TULLY, E. D., 1989: *The Mycoplasmas*, 5. Academic press, Inc. San Diego, USA.
- WOESE, C. R., 1987: Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2): 221.

- WOESE, C. R., MANILOFF, J., ZABLEN, L. B., 1980: Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1): 494–498.
- ZHAO, Y., SUN Q., WEI, W., DAVIS, R. E., WU, W., LIU, Q., 2009. ‘*Candidatus Phytoplasma tamaricis*’, a novel taxon discovered in witches’ broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 2496–2504.
- ZREIK, L., CARLE, P., BOV, J. M., GARNIER, M., 1995: Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches’ broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, ‘*Candidatus phytoplasma aurantifolia*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3): 449–453.
- YVON, M., THÉBAUD, G., ALARY, R., LABONNE, G., 2009: Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’. *Molecular and cellular probes*, 23(5): 227–234.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- EICHMEIER, A., KISS, T., NEČAS, T., PEŇÁZOVÁ, E., TEKIELSKA, D., BOHUNICKÁ, M., VALENTOVÁ, L., ČMEJLA, R., MORAIS D., BALDRIAN, P., 2018: High-throughput sequencing analysis of the bacterial community in stone fruit phloem tissues infected by '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. *Microb Ecol.*, 2018 Sep 7. doi: 10.1007/s00248-018-1250-9.
- BOHUNICKÁ, M., VALENTOVÁ, L., SUCHÁ, J., NEČAS, T., EICHMEIER, A., KISS, T., ČMEJLA, R., 2018: Identification of 17 '*Candidatus Phytoplasma pyri*' genotypes based on the diversity of the imp gene sequence. *Plant Pathology*, 64 (4): 971–977, ISSN 0032-0862.
- BOHUNICKÁ, M., VALENTOVÁ, L., SUCHÁ, J., NEČAS, T., EICHMEIER, A., KISS, T., ČMEJLA, R., 2018: Study of '*Candidatus Phytoplasma spp.*' in pears in the Czech Republic based on imp gene genotyping. In: XXI. česká a slovenská konference o ochraně rostlin: Sborník abstraktů. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2018: 32. ISBN 978-80-7509-562-6.
- KISS, T., NEČAS, T., 2018: Vplyv aplikácie fytohormonův na fytoplazmu ESFY rodu *Prunus*. *Odborný recenzovaný časopis*. sv. 1: 60–63, ISSN 1213-7596.
- KISS, T., NEČAS, T., NEČASOVÁ, J., 2016: Comparison of real-time PCR protocols in detection and quantification of fruit tree 16 SrX group phytoplasmas. *Genetika*, 48 (2): 629–642, ISSN 0534-0012.
- NEČASOVÁ, J., NEČAS, T., EICHMEIER, A., KRŠKA, B., 2016: Use of real-time PCR for the characterization of variable symptoms in ESFY phytoplasma disease. *Acta Horticulturae*, 1110: 57–62, ISSN 0567-7572.
- MAŠKOVÁ, V., KRŠKA, B., NEČAS, T., 2009: Comparison of methods of isolating DNA for ESFY phytoplasma detection. *Acta Horticulturae*, 825: 213–220, ISSN 0567-7572.
- NEČAS, T., KRŠKA, B., MAŠKOVÁ, V., ADAM, M., 2008: Influence of the time of sampling on detection of ESFY phytoplasma. *Acta Horticulturae*, 781: 435–441, ISSN 0567-7572.
- NEČAS, T., KRŠKA, B., 2005: Detection of phytoplasma ESFY in apricot trees using phloem and petioles. *Plant protection science*, 41 (4): 132–140, ISSN 1212-2580.

Název: Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin skupiny 16 SrX ('*Candidatus* Phytoplasma prunorum', '*Candidatus* Phytoplasma mali' a '*Candidatus* Phytoplasma pyri') pomocí real-time PCR
Certifikovaná metodika

Autor: Tomáš Kiss, Tomáš Nečas,
Jana Nečasová, Jan Wolf a Ivo Ondrášek

Fotografie: Ing. Tomáš Nečas, Ph.D.

Vydala: Mendelova Univerzita v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: první, 2019

Počet stran: 80

Náklad: 50 ks

ISBN 978-80-7509-632-6

