METODIKA PRO PRAXI

DETEKCE PŮVODCŮ KOROVÝCH NEKRÓZ A PŘEDČASNÉHO ODUMÍRÁNÍ MERUNĚK A BROSKVONÍ,

především bakteriemi komplexu *Pseudomonas syringae,* v množitelských materiálech a v produkčních sadech

Kolektiv autorů

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2020

ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE
VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v. v. i.

KOLEKTIV AUTORŮ

Ing. Iveta Pánková, Ph.D., Ing. Václav Krejzar, Ph.D.,
Ing. Radka Krejzarová, Ph.D., Ing. Barbora Soukupová
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

DEDIKACE

Metodika je plánovaným výstupem projektu NAZV QK1920058 „Inovace integrované produkce teplomilného ovoce se zaměřením na zdravotní stav produkčních výsadeb a rozmnožovacího materiálu peckovin“a s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci řešení institucionálního projektu č. RO0418, Etapy č. 21: „Zvýšení účinnosti regulace fytopatogenních prokaryot“.

Metodika je určena pro množitele a produkční pěstitele genotypů meruněk a broskvoní, pro orgány státní správy – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Ministerstvo zemědělství ČR Odbor komodit.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. UKZUZ 183619/2020 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837“.

OPONENTI

Prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D. - *Mendelova univerzita v Brně*
RNDr. Jan Juroch - *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský*

Vydal: ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6 - Ruzyně

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2020
ISBN 978-80-7427-330-8

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i.

OBSAH

1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY 5

1.1. Spektrum bakteriálních původců předčasného odumírání teplomilných peckovin 7

1.2. Fytoplazmy vyvolávající předčasné odumírání teplomilných peckovin 12

1.3. Původci houbových chorob vyvolávající nebo přispívající k předčasnému odumírání teplomilných peckovin 13

1.4. Determinace původců korových nekróz a předčasného odumírání teplomilných peckovin 14

2. CÍL METODIKY 18

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY 18

3.1. Odběr vzorků rostlinných pletiv 18

3.2. Zpracování vzorků, izolace a kultivace potenciálních patogenů 19

3.2.1. Zpracování vzorků, izolace a kultivace kmenů bakterií 20

3.2.2. Zpracování vzorků a izolace fytoplazem 20

3.2.3. Zpracování vzorků, izolace a kultivace kmenů hub 20

3.3. Identifikace biochemickými, chemickými a molekulárně genetickými metodami 21

3.3.1. Biolog 21

3.3.2. FAME 23

3.3.3. PCR 24

3.3.3.1. Extrakce DNA 24

3.3.3.2. Real-time PCR 25

3.3.3.3. Konvenční a nested PCR 26

3.3.3.4. Elektroforéza 27

3.4. Stanovení fytopatogenních vlastností 28

3.4.1. Test hypersenzitivity na tabáku 28

3.4.2. Test patogenity na mladých rostlinách bobu nebo rajčete 29

3.4.3. Test patogenity na výhonech meruněk a broskvoní 29

3.4.4. Test patogenity na semenáčcích teplomilných peckovin 30

3.4.5. Kompetitivní test 30

3.4.6. Testování patogenity fytoplazem 32

3.4.7. Testování patogenity u potenciálních houbových patogenů 32

3.5. Nukleační aktivita fytopatogenních a dalších kompetitivně významných epifytních bakterií 32
3.6. Metody, roztoky, média a jejich příprava 33
3.6.1. Zpracování vzorků rostlinných pletiv 33
3.6.2. Izolace, kultivace 34
3.6.3. FAME 34
3.6.4. Izolace DNA 35
3.6.5. PCR - bakterie 36
3.6.6. PCR – fytoplazmy 38
3.6.7. PCR - houby 42
3.6.8. Elektroforéza 45
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ 45
5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 46
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY 47
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 48
8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ 51
9. SEZNAM TABULEK 52
10. OBRAZOVÁ ČÁST 53

Detekce původců korových nekróz a předčasného odumírání meruněk a broskvoní, především bakteriemi komplexu *Pseudomonas syringae*, v množitelských materiálech a v produkčních sadech

1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY

Jednou z nejčastějších příčin významných ekonomických ztrát v produkčních sadech teplomilných peckovin v České republice, zejména v produkčních výsadbách meruňky (*Prunus armeniaca* L.), je snížení životnosti a předčasné odumírání. K postupnému zhoršování zdravotního stavu dochází nejčastěji u stromů do 3-5 let od výsadby (obr. 2, 3), ale i starších (obr. 1). V počáteční fázi se projevuje zčernalými vrcholy výhonů do vzdálenosti několika cm (obr. 4), zavadáním rašících pupenů, spálou květů, tvorbou skvrn a nekrotických lézí na listech (obr. 5, 6, 7, 8) a plodech. Pokročilá fáze syndromu je charakteristická tvorbou korových nekróz na kmeni, kosterních a terminálních větvích a letorostech během vegetace a dormance (obr. 9, 10, 11, 12, 13). U oslabených rostlin dochází k poklesu produkce ovoce a v konečném důsledku k předčasnému odumírání stromů.

Obr. 1: Předčasné odumírání meruňky ve starší výsadbě

Obr. 2: Mladá výsadba meruňky s příznaky syndromu předčasného odumírání

Obr. 3: Detail příznaku syndromu předčasného odumírání v mladé výsadbě meruňky v podobě nekrózy korového pletiva na kosterní větvi

Obr. 4: Zčernalý vrchol výhonu meruňky v období dormance

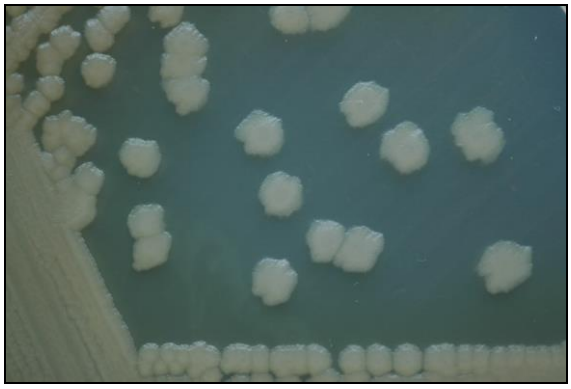
Obr. 5, 6, 7, 8: Skvrny a nekrotické léze na listech meruňky a broskvoně způsobené bakteriemi rodu *Pseudomonas*

Obr. 9, 10, 11, 12, 13: Nekrózy korového pletiva na kosterních větvích meruňky způsobené bakteriemi rodu *Pseudomonas*

1.1. Spektrum bakteriálních původců předčasného odumírání teplomilných peckovin

Dominantními původci korových nekróz a předčasného odumírání jsou bakterie z komplexu *Pseudomonas syringae* (*Ps*). Během posledních 10 let se bakterie *Pseudomonas syringae* (obr. 14) staly nejvýznamnějšími patogeny v produkčních výsadbách ovocných dřevin po celé Evropě – peckovin, citrusů a skořápkatého ovoce. Ztráty v produkčních sadech třešní ve Velké Británii se pohybují podle lokality mezi 50-100 % (Vicente et al., 2004), kolem 50 % v produkčních výsadbách švestek a slivoní v Holandsku (Wenneker et al., 2012). U meruněk se ztráty úhynem stromů do 8 let po výsadbě pohybují od více než 50 % ve Francii a Itálii, až po 80 % v Turecku (Kotan and Sahin, 2002). Choroba je významná celosvětově.

Nejvíce ohrožené jsou produkční sady meruněk v oblasti vysočin (400-700 m n. m.) charakterizované vlhkými zimami s teplotami kolem nuly, jarními obdobími s výskytem mrazů v době rašení a lehkými konduktivními půdami se sklonem k vysychání během letních měsíců. V České republice se ztráty v produkčních výsadbách meruňky do pěti let po výsadbě pohybují dle lokality v rozmezí 20-50 %. Výskyt alespoň některého příznaku choroby je u desetiletých stromů 100 %.



Obr. 14: Drsné kolonie bakterie *Pseudomonas syringae* na živném médu

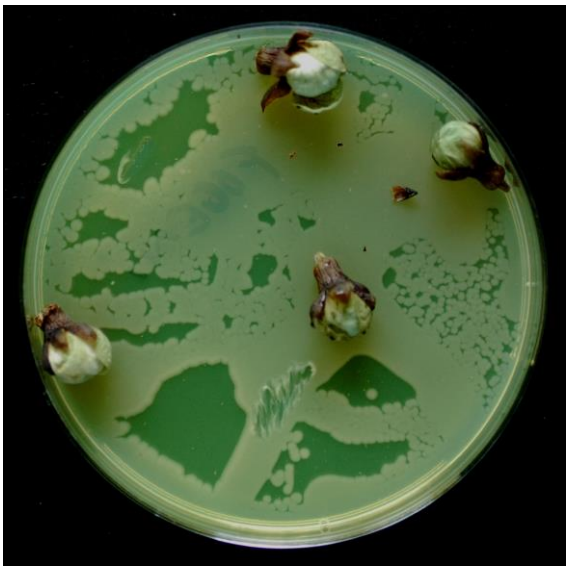
Zdrojem primárního inokula je epifytní mikroflóra na květech a listech stromů, bakterie pak do korových pletiv pronikají přes mechanická poranění během vegetace nebo na konci vegetace do drobných ranek po opadu listů. Rezervoárem původců korových nekróz mohou být i byliny běžně rostoucí v produkčních sadech nebo jejich blízkém okolí (Parisi et al., 2019). Druhým zdrojem mohou být systemicky infikované rouby použité k výrobě sazenic teplomilných peckovin (Chandler and Daniell, 1976). Původce korových nekróz meruněk, broskvoní, švestek a třešní je vaskulární patogen, který se po proniknutí do rostliny šíří do všech částí stromu cévními svazky v xylému a floému (obr. 15, 16).

Obr. 15: Nekrotické cévní svazky uvnitř výhonů meruňky při vysoké četnosti infekce

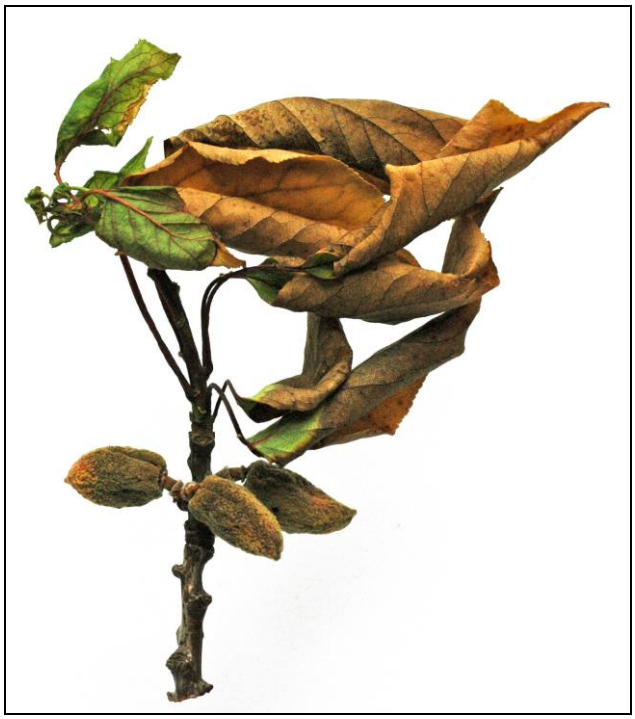
Obr. 16: Nekrotické cévní svazky uvnitř výhonů meruňky při nízké četnosti infekce

Cyklus choroby je obvykle iniciován na jaře kolonizací květů a následným intenzivním množením patogenu (obr. 17, 18). Během vlhkého a chladného počasí je při koncentraci vyšší než 10^4 buněk/ml patrné hnědnutí květů, označované jako spála květů. Při masivním napadení květů proniká infekce do plodů, případně korových pletiv (obr. 9, 10, 11, 12, 13) a vyvolává tvorbu lézí na listech (obr. 5, 6, 7, 8). K hlavnímu průniku bakterie z epifytu do korových pletiv stromu dochází po mechanických poškozeních způsobených zejména jarním mrazy (Vigouroux, 1989; Weaver, 1978) (obr. 19, 20, 21). Po několikadenní periodě chladného a vlhkého počasí dochází k tvorbě korových nekróz v místě mechanického poškození. Bakterie přežívá a množí se v korových pletivech. Korové nekrózy se během chladného vlhkého počasí v období dormance a předjaří zvětšují. Současně bakterie pronikají prostřednictvím chemotaxe do cévních svazků floemu a xylemu a jsou rozváděny do všech částí stromu. Usazují se v terminálních a kosterních větvích a uvnitř kmenu stromu. Při vyšší koncentraci se vytvořenými shluky exsudátů ucpávají vodivé svazky a přerušuje se přívod živin a vody (Lamichhane et al., 2015). Odumírají jednotlivé větve, části stromu, v případě rozsáhlé infekce celé stromy. Choroba se v evropských produkčních sadech projevuje v různém stupni závažnosti u 10-30 % 2-8 letých stromů meruňky (Parisi et al., 2019). Současně část inokula přežívá v epifytu na listech stromů (obr. 22). Jeho koncentrace stoupá v průběhu jara, klesá v průběhu léta a opět narůstá při poklesu teplot na podzim. V době senescence se přesouvá do jizev po opadu listů a v období dormance přežívá ve spících pupenech.

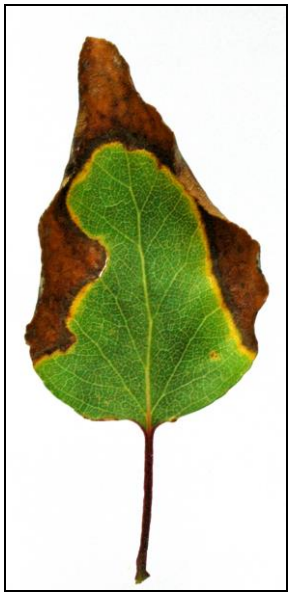
Obr. 17: Epifyt květů meruňky kolonizovaný spektrem mikroorganizmů po smyvu na živné médium



Obr. 18: Čistá kultura bakterie *Pseudomonas syringae* na živném médiu po smyvu z květů meruňky



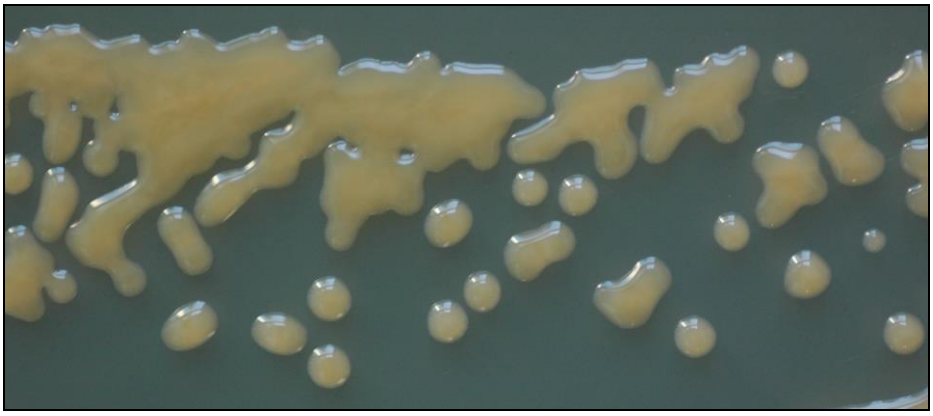
Obr. 19, 20: Výhony, listy a plody meruňky poškozené působením jarních mrazů



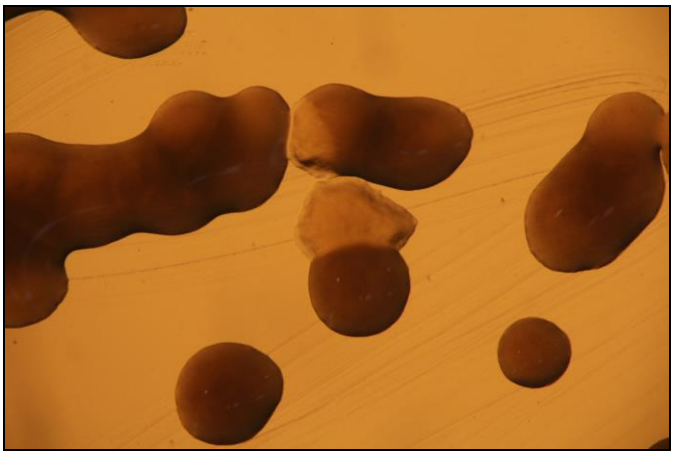
Obr. 21: Detail mrazového poškození čepele listu meruňky

Obr. 22: Epifytní mikroflóra listů meruňky po smyvu na živné médium

Spektrum patogenů a hostitelů *Pseudomonas syringae* komplex zahrnuje více než 60 druhů a patovarů, které jsou původci ekonomicky významných chorob téměř všech významných plodin (Lamichhane et al., 2014, 2015) (obr. 23, 24).



Obr. 23: Fluidní (hladká) virulentní kultura determinované bakterie *Pseudomonas taetrolens* s extracelulárním polysacharidovým slizem na povrchu buněk, získaná z nekrotické léze na korovém pletivu meruňky (viz obr. 3) v období před začátkem kvetení



Obr. 24: Fluidní (hladká) virulentní kultura determinované bakterie *Pseudomonas taetrolens* přecházející v drsnou slabě virulentní formu během kultivace na živném médiu

V současnosti je známo, že korové nekrózy a předčasné odumírání teplomilných peckovin vyvolává pět patovarů *Ps*, které patří do čtyř fyloskupin (phylogroups, PG; Berge et al., 2014).

Do skupiny PG01 byly zařazeny patogeny plané třešně (*Prunus avium* L.) *Ps* pv. *avii,* třešně (*Prunus avium* L.) *Ps* pv. *morsprunorum* rasa 2, nově pojmenovaná jako *Pseudomonas amygdali* pv. *morsprunorum* (patothype strain MAFF302280PT; Gomila et al., 2017), broskvoně (*Prunus persica* (L.)Batsch), nektarinky (*Prunus persica* var. *nucipersica*) a japonské slivoně (*Prunus salicina* Lindl.) karanténní bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* (Prunier, Luisetti and Gardan, 1970; Young, Dye and Wilkie, 1978; typový kmen LMG 5184).

Do skupiny PG02 byl zařazen patovar *Ps* pv. *syringae*, patogenní především pro meruňku, broskvoň, slivoň a planou i kulturní třešeň.
Do skupiny PG03 byl zařazen patovar *Ps* pv. *morsprunorum* rasa 1 (*Pseudomonas amygdali* pv. *morsprunorum*, pathotype strain FTRS U7805) patogenní na meruňce, třešni a slivoni.
Na broskvoních se může rovněž vyskytovat karanténní bakterie *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, původce bakteriální tečkovitosti. Napadené stromy mají nejčastěji v místě tečkovitých nekróz proděravělé listy (shot-hole disease) a zčernalé špičky na přezimujících letorostech, v extrémním případě způsobuje bakterie sezónní defoliaci stromů a odumření napadených letorostů (obr. 25).

Obr. 25: Nekrotický vrchol výhonu broskvoně doprovázený výronem slizu po infekci bakterií *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

1.2. Fytoplazmy vyvolávající předčasné odumírání teplomilných peckovin

Náhlé vadnutí a předčasné odumírání teplomilných peckovin vyvolává i fytokaranténní fytoplazma *Candidatus* Phytoplasma prunorum (*Ca.* P. prunorum), původce choroby obecně označované jako European stone fruit yellows, česky fytoplazma evropské žloutenky peckovin (fytoplazma ESFY), šířené vektorem *Cacopsylla pruni*. Nejcitlivější vůči této fytoplazmě jsou genotypy meruňky, kde vyvolává tvorbu chlorotických skvrn a svinování listů (chlorotic leaf roll of apricot), broskvoně (yellow and decline diseases of peach) a japonské slivoně (leptonecrosis of Japanese plum). V současnosti je výskyt *'Ca. P. prunorum'* hlášen v 11 zemích EU a 6 zemích mimo EU (Steffek et al., 2012). Ve všech zemích jsou i s ohledem na chybějící studie rozšíření monitorována pouze lokální ohniska výskytu

vázaná na produkční sady, zejména meruněk a broskvoní. Významné rozšíření bylo zaznamenáno v Polsku (Cieślińska, 2011). Studie provedené v letech 2013-2019 prokázaly plošné rozšíření fytoplazmy i hlavního vektoru v Německu, Maďarsku a Rakousku (Riedle-Bauer et al., 2019; Jarausch et al., 2019). V České republice byla přítomnost '*Ca.* P. prunorum' potvrzena v průzkumu publikovaném v roce 2001 (Navrátil et al., 2001) a na několika příznakových stromech třešní a meruněk ve východních Čechách v roce 2011 (Ludvíková et al., 2011), aktuální plošná studie chybí. Vzhledem k prokázanému výskytu v produkčních sadech meruňky v Rakousku v blízkosti hranic s ČR a výskytu v produkčních sadech a na planých rostlinách v Bavorsku a Sasku je pravděpodobnost plošného rozšíření v ČR vysoká. Obdobné příznaky jako bakterie *Ps* a '*Ca.* P. prunorum' vyvolávají na broskvoních i další nekaranténní fytoplazmy, původci chorob western X-disease a PYLR (peach yellow leaf roll). Broskvoně bývají často také infikovány patogeny *'Ca. P. phoenicium'*, *'Ca. P. asteris'*, *'Ca. P.* australiense'.

1.3. Původci houbových chorob vyvolávající nebo přispívající k předčasnému odumírání teplomilných peckovin

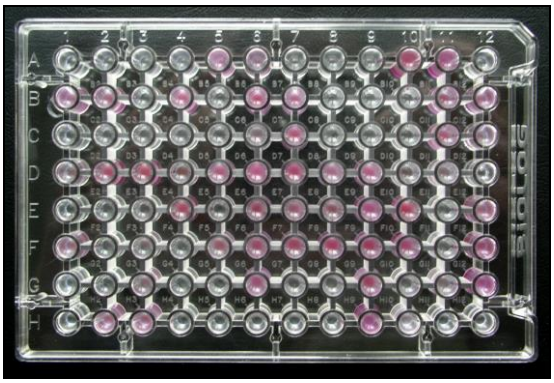
Z houbových patogenů způsobuje tvorbu korových nekróz několik skupin, průběh tvorby nekróz a vadnutí je většinou pozvolný a nevede k náhlému odumírání mladých stromků. Velikost inokula a rozvoj choroby lze omezit fungicidními prostředky. Příznakem Eutypa dieback je náhlé vadnutí letorostů až terminálních větví plně produkčních stromů meruněk, broskvoní a třešní v průběhu letních měsíců. Chorobu vyvolávají houby z rodu *Eutypa* (Travadon and Baumgartner, 2015) *Eutypa lata* (Pers:Fr.) Tul. & C. Tul. (=*Eutypa armeniacae* Hansf. & Carter). Odumírání výhonů a terminálních větví vyvolává i houba *Botryosphaeria dothidea*, hlavním příznakem je tvorba mnoha vodnatých, do rezava zabarvených nekróz (Huang et al., 2019). Fytopatogenní houby z rodu *Monilinia* (*M. laxa*, *M. fructigena, M. fructicola*) a *Monilia polystroma* vyvolávají komplex příznaků označovaný jako brown rot disease (Côté et al., 2004) zahrnující především hnilobu plodů, moniliový úžeh, spálu květů a tvorbu nekróz na letorostech. Hlavní aktivita patogenů se projevuje v období dozrávání teplomilných peckovin, a proto způsobuje velké ekonomické škody během sklizně (*M. fructicola*) a uskladnění plodů (*M. laxa*, *M. fructigena*). Výskyt karanténního patogenu *M. fructicola* nebyl v ČR prokázán. Významná přítomnost houbových patogenů na teplomilných peckovinách je determinována až sekundárně. Poraněná pletiva primárně oslabených stromů jsou kolonizována saprofytickými, patogenními a později parazitickými houbami. Fytopatogenní houby *Leucostoma persoonii, Leucostoma cinctum* (teleom.) a *Cytospora leucostoma*, *Cytospora cincta* (anam.) vyvolávají komplex příznaků označovaný jako Leucostoma canker (Adams et al., 2002) (obr. 26). Napadají různé části stromů celkově oslabené

kombinací různých biotických a abiotických faktorů a urychlují jejich odumírání. Příznaky vyvolané především *Cytospora* sp. na starších nebo oslabených stromech mohou být obdobné jako u Eutypa dieback na vitálních stromech v plně produkčním období. Při náhlém kolapsu větví listy neopadávají, ale i v zaschlém stavu zůstávají přisedlé k větvím. Před kolapsem se příznaky infekce většinou neprojevují, pouze ojediněle se listy prohýbají a zastavují růst. Na postižených větvích dochází na korovém pletivu k tvorbě nekrózy doprovázené výronem kleje. Infekce postupuje od vrcholů větví směrem ke kmeni, na povrchu jsou patrné fruktifikační orgány. Původcem dírkovitosti listů, která vzniká v důsledku vypadávání nekrotických listových lézí (shot-hole disease), je houba *Clasterosporium carpophilum* způsobující sezónní žloutnutí, případně opadávání listů.

Obr. 26: Příznaky Leucostoma canker na letorostu broskvoně

1.4. Determinace původců korových nekróz a předčasného odumírání teplomilných peckovin

Determinace kultivovatelných bakteriálních původců korových nekróz a předčasného odumírání teplomilných peckovin je u izolovaných kmenů založena na stanovení biochemických charakteristik metodou Biolog GEN III (obr. 27), chemických charakteristik spektra mastných kyselin metodou FAME (obr. 28) a molekulárně genetických charakteristik metodou real-time PCR (obr. 29).



Obr. 27: Metabolický profil bakterie *Pseudomonas syringae* determinované metodou Biolog GEN III

Obr. 28: Plynový chromatograf - Agilent Technologies - pro determinaci fytopatogenních bakterií metodou FAME

ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Obr. 29: Přístroj Rotor-Gene Q pro determinaci fytopatogenních bakterií metodou real-time PCR

K odhalení přítomnosti nízkých koncentrací patogenů v extraktech (100-1000 buněk/1 ml) se využívá metoda real-time PCR. Úspěšná amplifikace charakteristické sekvence nukleové kyseliny (NK) je závislá na eliminaci inhibitorů z rostlinných pletiv, kontaminací z prostředí a na výtěžnosti DNA patogenu během její extrakce. K dosažení maximální výtěžnosti bakteriální DNA se využívají speciální komerční kity a protokoly nebo kombinace několika protokolů extrakce (SYNERGY 2.0™, OPS Diagnostics, USA; Microbiome DNA Isolation Kit, Norgen Biotek, Canada; DNeasy Plant Pro Kit, Qiagen, Germany; GenExTM Plant Plus kit, GeneAll, Korea a další). Patovary *Ps* spojené s teplomilnými peckovinami syntetizují několik velmi dobře charakterizovaných fytotoxinů, které se využívají při jejich diferenciaci. Metodami PCR je možné detekovat geny zapojené do syntézy lipodepsipeptidu syringomycinu *syrB* (Bultreys and Gheysen, 1999), sekrece syringomycinu *syrD* a produkce koronatinu *cfl* (Bereswill et al., 1994). Universální detekce komplexu *Ps* s 97 % spolehlivostí je možná primery *Psy* (Guilbaud et al., 2016). Komplex *Ps* zahrnuje 13 fyloskupin (PG1-PG13), původci korových nekróz na teplomilných peckovinách byly podle publikovaných studií zařazeny do fyloskupiny PG1, PG2, PG3 a PG7-8 (Parisi et al., 2019). K stanovení

příslušnosti kmene do fyloskupiny komplexu *Ps* (Berge et al., 2014) se využívá detekce jednoho nebo několika konstitutivních genů PG1 (*gyrB*), PG7-8 (*shcF)* nebo nekonstitutivních genů PG2 (DUF421), PG3 (DUF1835). Metody PCR s PG primery dosahují 99-100% specifity pro bakteriální suspenze o koncentraci 10^5 buněk/ml (tj. $2x10^3$ buněk/2 µl v PCR směsi). K identifikaci kmenů komplexu *Ps* sekvenací a metodou PCR na úroveň patovarů se využívají i konstitutivní geny *rpoD* (Sarkar and Guttman, 2004; Rajwar and Sahgal, 2016) a *cts* (Berge et al., 2014). Nové možnosti přesné a rychlé identifikace patogenů v rostlinných extraktech a smyvech do budoucna dává metoda NGS (Knief, 2014).

Vedle přesné determinace kmenů patogenů biochemickými, chemickými nebo molekulárně genetickými metodami je pro vyhodnocení jejich potenciální škodlivosti v produkčních výsadbách a při výrobě školkařských výpěstků nezbytné stanovit jejich nukleační aktivitu, virulenci a kompetitivní vlastnosti, to je schopnosti kolonizovat rostlinná pletiva a vyvolávat tvorbu nekróz. Mezi původci korových nekróz a bakteriemi, které jsou součástí epifytu teplomilných peckovin, je přibližně 10 druhů, které přispívají k mrazovým poškozením rostlinných pletiv v jarním období a usnadňují následné pronikání patogenů *Ps* přes poškozená pletiva do rostliny (Morris et al., 2008). Vedle kmenů *Pseudomonas syringae* je proto v epifytu determinována přítomnost druhů *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas viridiflava, Pantoea agglomerans* a *Xanthomonas campestris.* U determinovaných kmenů se ověřuje schopnost produkovat izoformy INA proteinů a nukleačních jader postupným snižováním teploty lázně v kryostatu. Mezi klasifikační testy komplexu *Ps* patří i test hypersensitivity (HR) na tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) (obr. 50) (Klement and Goodman, 1967) a testy patogenity na mladých rostlinách bobu obecného (*Vicia faba* L.), rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), melounu cukrového (*Cucumis melo* L.) a letorostech třešně (*Prunus avium* L.), meruňky a broskvoně (Parisi et al., 2019). Schopnost kmenů přežívat v epifytní mikroflóře a kolonizovat povrch rostlinných pletiv, především listů, jako nezbytný předpoklad pro vyvolání choroby, je hodnocena v testu kompetitivních vlastností kmenů v testech *in vitro*.

Determinace fytoplazem jako příčinného agens je založena na molekulárně genetických metodách. Fytoplazmy jsou i v příznakových rostlinných pletivech přítomny ve velmi malé koncentraci. Identifikace je náročná, je třeba docílit maximální výtěžnosti DNA a vyloučit řadu zejména falešně negativních výsledků. Z komerčních kitů je pro extrakci DNA vhodný SynergyTM 2.0 Plant DNA Extraction Kit (OPS Diagnostics, USA). Vysoké koncentrace DNA lze docílit i podle modifikovaného CTAB (cetyl trimethylamonium bromidem) protokolu (Jarausch et al., 2011). Pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu patogenu předchází PCR se specifickými primery pre-amplifikace rDNA s primery zahrnujícími sekvenci celé 16SrRNA včetně 16/23S spacer region pro širší spektrum fytoplazmem na

dřevinách (Schneider et al., 1995). U teplomilných peckovin je následná identifikace v rámci AP skupiny (Apple proliferation group; 16SrX) zaměřena především na druh Phytoplazma *'Ca. P. prunorum'* metodou real-time PCR (Christensen et al., 2004; Hodgetts et al., 2009; Yvon et al., 2009) a konvenční nested PCR s následnou RFLP analýzou nebo sekvenací (Lorenz et al., 1995; Schneider et al., 1995). V současnosti se zejména jako konfirmační metoda pro prokázání přítomnosti patogenu v cévách a řapících používá fluorescenční mikroskopie s barvivem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; EPPO, 2001), naopak perspektivní jsou DNA barcoding a NGS metody (Next Generation Sequencing; EPPO, 2016).

Determinace houbových patogenů je založena především na kombinaci hodnocení makroskopických a mikroskopických charakteristik čistých kultur a výsledků jejich biochemických charakteristik metodou Biolog FF, chemických charakteristik spektra mastných kyselin metodou FAME. Z molekulárně genetických charakteristik se využívá real-time PCR, což umožňuje především identifikaci karanténní houby *Monilinia fructicola* (van Brouwershaven et al., 2010), konvenční PCR k identifikaci *Eutypa lata* (Lecomte et al., 2000; Catal et al., 2007) a rozlišení jednotlivých druhů *Monilinia,* včetně *M. laxa* (Hughes et al., 2000; Ioos and Frey, 2000; Côté et al., 2004) a sekvenace (Travadon and Baumgartner, 2015). Časově dostupné jsou testy patogenity na plodech broskvoně a meruňky, případně v řádu měsíců na senzitivních semenáčcích teplomilných peckovin.

Navrhovaná metodika vychází ze dvou předpokladů:

1) Hlavními původci korových nekróz a předčasného odumírání teplomilných peckovin ve střední Evropě a v České republice jsou bakterie. Zapojení hub jako primárních původců nekróz, vadnutí a odumírání není doposud prokázáno. Příznaky doprovázející zhoršení zdravotního stavu a předčasné odumírání v důsledku bakteriální infekce mohou být zaměňovány s příznaky, které mohou v určitém stádiu choroby vyvolávat i některé houby a fytoplazmy. Metodika na základě výše uvedených poznatků zahrnuje i determinaci fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' a houbových patogenů rodu *Monilinia* sp. a *Eutypa*.

2) Vedle přesné determinace patogenu je nezbytné i stanovení jeho patogenních a kompetitivních vlastností, které rozhodují o jeho úspěšnosti v interakci rostlina-patogen, a tím i o skutečném dopadu na hospodaření a perspektivu produkčních sadů a školek, které vyrábí sazenice teplomilných peckovin.

2. CÍL METODIKY

Cílem navrhované metodiky je:

1) popsat časový rozvrh, způsob odběru a velikost vzorků různých rostlinných pletiv ovocných dřevin;
2) popsat způsob zpracování různých typů vzorků v závislosti na typu determinační metody;
3) optimalizovat metody determinace včetně fytopatogenních vlastností a nukleační aktivity především bakteriálních původců korových nekróz;
4) vyhodnotit škodlivost determinovaných patogenů na základě testů kompetitivních schopností.

Při dodržení navrhovaného metodického postupu by mělo v produkčních sadech na dané lokalitě dojít:

1) ke stanovení podílu jednotlivých druhů mikroorganismů na zhoršeném zdravotním stavu a předčasném odumírání stromů teplomilných peckovin;
2) k vyhodnocení všech potenciálních zdrojů těchto mikroorganismů;
3) k optimalizaci možných ochranných opatření proti dalšímu zavlékání a šíření patogenu v produkčních výsadbách a aplikaci agrotechnických postupů podporujících zdraví a vitalitu stromů.

Při dodržení navrhovaného metodického postupu by mělo v školkařských podnicích dojít:

1) k eliminaci infikovaných roubových a podnožových materiálů;
2) k optimalizaci ochranných opatření proti infekci při výrobě roubovaných sazenic teplomilných peckovin.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

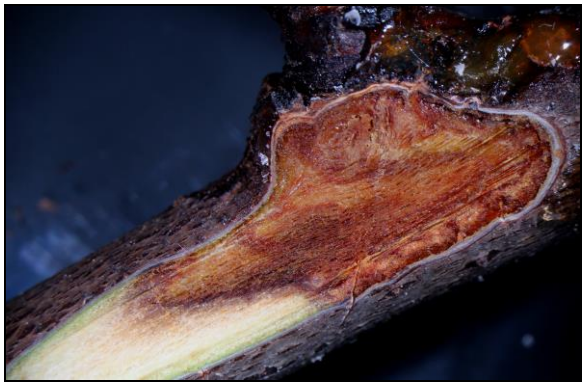
3.1. Odběr vzorků rostlinných pletiv

Pro podchycení vitálních původců korových nekróz je optimální začátek a konec vegetačního období s teplotami do 15°C a vyšší relativní vlhkostí (obr. 30). Při náhlém kolapsu lze odebrat vzorky kdykoliv během vegetační sezóny. Bakteriální původce korových nekróz v nízké koncentraci lze izolovat i během období dormance. Ve výsadbách se odebírá cca 20-30 cm větve, minimálně 5 cm nad a pod lézí. Nůžky se mezi odběrem jednotlivých vzorků dezinfikují použitím min. 75% etylalkoholu nebo 3% roztoku chlornanu sodného. Při kontrole roubových materiálů se z každého balení konkrétního genotypu vybírá 3-5 letorostů s minimálním počtem 50-60 oček. Všechny vzorky se přepravují a uskladňují před zpracováním při teplotě do 10°C, ideálně v lednici.

Pro podchycení původců choroby v epifytní mikroflóře pupenů, květů (obr. 31) a listů (obr. 32) je optimální období jara a pozdního léta (začátek září), před přesunem patogenu do jizev po opadu listů. Odběr je třeba provádět s doporučeným odstupem od aplikace některých fungicidních a baktericidních postřiků (minimálně jeden týden). Odběr se provádí v rukavicích. Vzorek pupenu, květu nebo listu se odstřihne přímo do zkumavky s 8 ml sterilní neionizované vody (sdH_2O) s přídavkem 0,1 ml Tweenu 20 nebo na Petriho misku s médiem King B (King et al., 1954, kapitola 3.6.2.) a bramborovým agarem s přídavkem glukózy (PDA, kapitola 3.6.2.). Zkumavky a misky se v chladu převezou do laboratoře. Zkumavky se přes noc inkubují na třepačce při pokojové teplotě. Do Petriho misek se pro zvýšení vlhkosti přidá cca 50 µl sterilní vody a misky se inkubují 24-48 h při pokojové teplotě.

Obr. 30: Nekrotická léze na povrchu kosterní větve meruňky
Obr. 31: Květy meruňky odebírané pro monitorování spektra epifytní mikroflóry
Obr. 32: Listy meruňky odebírané pro monitorování spektra epifytní mikroflóry

3.2. Zpracování vzorků, izolace a kultivace potenciálních patogenů



Obr. 33: Přechod mezi zdravou a infikovanou částí výhonu meruňky původcem korové nekrózy na podélném řezu

3.2.1. Zpracování vzorků, izolace a kultivace kmenů bakterií

Při zpracování vzorků korových pletiv se povrch nejprve dezinfikuje 75 % etylalkoholem. Odřízne se vrchní část korových pletiv. Na podélném řezu (obr. 33) se na okraji léze odeberou segmenty do 1 cm^2. Pro izolaci bakteriálních patogenů se cca 1-2 g vnitřních korových pletiv maceruje ve 2ml sterilní sdH_2O a 10-20 µl se nanáší na misky s živným agarem King B nebo MPA (kapitola 3.6.2.). Část macerátu se použije na izolaci DNA a část se uschová při -20°C. Kolonie potenciálních patogenů a dalších doprovodných, potenciálně nukleačně aktivních bakterií jsou z misek odebírány po 24 h až 5 dnech kultivace při 28°C a očkovány podle typu kolonie na nové živné médium King B. Po 2-5 dnech jsou připraveny čisté kultury bakterií vhodné pro determinaci a testy patogenity.
Ve druhé zkumavkové variantě se roztok ze smyvu přelije do sterilní zkumavky a centrifuguje 10 minut při pokojové teplotě a 5000 g. Pelet se naředí 1ml sdH_2O a důkladně promíchá na vortexu. Pipetou se 20µl extraktu nanese a rozetře na Petriho misky s živným médiem King B vhodným pro kultivaci bakterií. Postup izolace bakterií je shodný s postupem popsaným při přímém kladení vzorků na živná média (obr. 18, 19, 23). Z části extraktu se izoluje DNA pro následnou determinaci metodou PCR a část je uschována při -20°C.

3.2.2. Zpracování vzorků a izolace fytoplazem

Izolace fytoplazem by měla probíhat co nejdříve po odběru vzorků. Na přechlazené ploše se z listů vyřezávají centrální cévní svazky, z větví části floemu a okamžitě se macerují ve vychlazené třecí misce v 2 ml chladného maceračního pufru (kapitola 3.6.1.). K macerovaným pletivům se postupně za stálého míchání přidává 15 ml chladného extrakčního pufru a následně se celý objem centrifuguje 4 min ve vychlazené centrifuze při 5700 g. Supernatant se v nové zkumavce centrifuguje 25 min při teplotě v blízkosti nuly a 9500 g. Po druhé centrifugaci se pelet naředí 1-2 ml sdH_2O. Alternativně lze maceraci provádět v lyzogenním pufru (QuickPick™ SML Plant DNA kit, Bio-Nobile) v kombinaci s vazbou na magnetické kuličky v přístroji KingFisher® mL (Thermo Scientific; Mehle et al., 2013) nebo v tekutém dusíku. Z části hrubého extraktu se izoluje DNA a část se uchová při -20°C.

3.2.3. Zpracování vzorků, izolace a kultivace kmenů hub

Při zpracování vzorků korových pletiv se povrch nejprve dezinfikuje 75% etylalkoholem. Odřízne se vrchní část korových pletiv. Na podélném řezu se na okraji léze odeberou segmenty do 1 cm^2.
Část segmentů se klade za účelem izolace potenciálních houbových patogenů na Petriho misky s bramborovým agarem (PDA, kapitola 3.6.2.) s přídavkem

antibiotik pro potlačení růstu bakterií a nejčastějších houbových kontaminantů *Rhizopus stolonifer* and *Botrytis cinerea*. Části větví lze umístit i do vlhké komůrky na 24-48 h při teplotě 24°C. Aktivní spory se následně setřou sterilním vatovým tamponem a nanesou na PDA agar s přídavkem antibiotik. Přítomnost houbových patogenů je monitorována po dobu 4-7 dní kultivace při 24°C ve tmě. Mycelium je přepichováno na nové PDA a V8 živné médium (kapitola 3.6.2.). Po 5-10 dnech je připravena čistá kultura vhodná pro determinaci metodou Biolog FF.
Ve druhé zkumavkové variantě se postupuje stejně jako u bakterií. Naředěný koncentrát extraktu se po 20 µl nanese a rozetře na živná média PDA a V8 agar s přídavkem antibiotik pro potlačení růstu bakterií a saprofytních hub (kapitola 3.6.2.). Postup izolace je shodný s postupem popsaným při přímém kladení vzorků na živná média. Z části extraktu se izoluje DNA pro následnou determinaci metodou PCR a část je uchována při -20°C.

3.3. Identifikace biochemickými, chemickými a molekulárně genetickými metodami

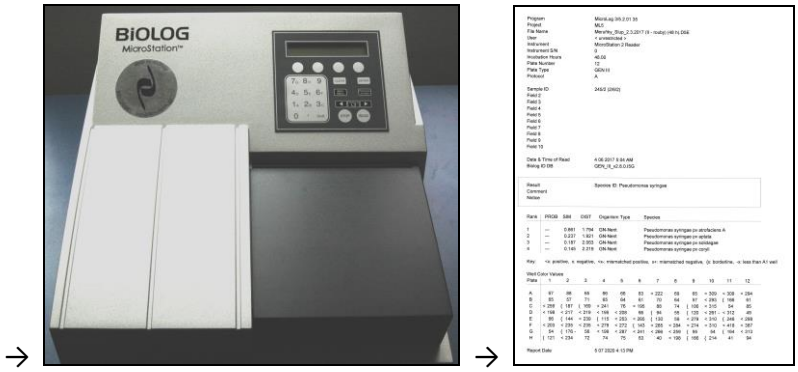
Při identifikaci čistých kultur potenciálních bakteriálních a houbových původců korových nekróz se využívá metoda Biolog. Pro identifikaci bakterií se využívá metoda GEN III, pro identifikaci hub metoda FF v kombinaci s mikroskopickými a makroskopickými snímky kultur. Druhou možností identifikace bakteriálních a houbových patogenů je metoda FAME založená na rozdílném kvalitativním a kvantitativním zastoupení mastných kyselin C9-C20 u jednotlivých entit. Třetí možností identifikace houbových a bakteriálních patogenů jsou po extrakci DNA molekulárně genetické metody. Patogen nebo skupinu patogenů, houby a bakterie včetně fytoplazem, lze pomocí specifických primerů determinovat i v rostlinných extraktech. V metodice jsou uvedeny metody real-time PCR, konvenční a nested PCR. U kmenů, které nelze identifikovat žádnou z výše uvedených metod se využívá sekvenace. Rozšířená a dostupná je hlavně Sangerova metoda, vhodná pro krátké sekvence jednovláknové DNA. Vzhledem k ceně přístrojového vybavení se provádí především formou zakázky u specializovaných firem. Příprava vzorků a směsí pro sekvenaci se liší podle firmy. Další metody první (pyrosekvenace) a druhé generace (NGS), které sekvenují celé krátké fragmenty genomu, jsou cenově náročné. Popis těchto metod přesahuje rámec metodiky.

3.3.1. Biolog

Biolog (Biolog Hayward, CA, USA) je metoda založená na biochemické charakteristice kmenů, na jejich schopnosti využívat jednotlivé definované chemické látky (obr. 34-40). Testování kmenů probíhá na 96 jamkových destičkách s 95 lyofilizovanými substráty. Ke každému substrátu je přidáno

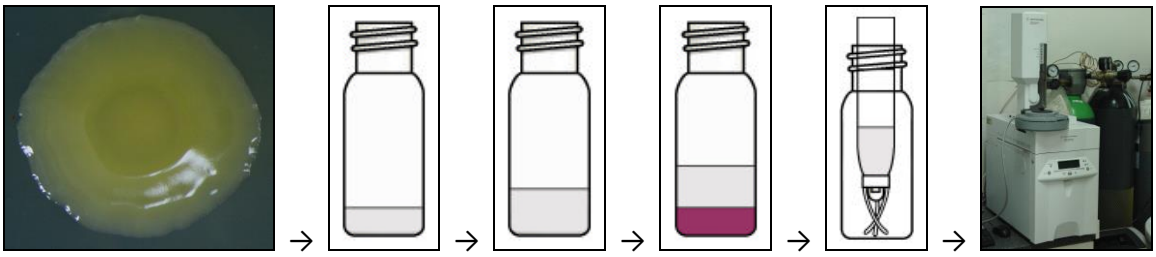
oxidačně redukční činidlo tetrazolium chlorid. Pokud mikroorganismus danou chemickou látku využívá, projeví se oxidace substrátu barevnou změnou TTC (2,3,5 triphenyltetrazolium chlorid). Intenzita fialového zabarvení každé jamky se hodnotí spektrofotometricky při 490 nm. Výsledky 95 oxidačně redukčních reakcí se porovnávají s vybranou databází metody. Pokud je index podobnosti (SIM) s určitou entitou v databázi SIM ≥ 0,5 a odstup od dalších variantních entit DIST ≥ 8,0, pak je kmen spolehlivě identifikován. Potenciální bakteriální původci korových nekróz se kultivují a zpracovávají podle Biolog protokolu A vhodného pro většinu aerobních gramnegativních i grampozitivních entit. Bakteriální suspenze připravené podle vhodných protokolů jsou nakapávány do stejného typu 96 jamkové destičky se substráty GEN III. Intenzita fialového zabarvení je hodnocena po 16, 24 a 48 h inkubace při 28°C. Pro potenciální houbové patogeny se suspenze připravuje podle jednotného protokolu. Suspenze se kape do 96 jamkových destiček FF a intenzita zabarvení se vyhodnocuje po 24h - sedmi dnech inkubace při 26°C v jedné z 6 databází. Pro identifikaci houbových patogenů je využívána databáze Air a Filamentous Fungi. Kmeny se hodnotí podle indexu podobnosti SIM a mikroskopických a makroskopických snímků mycelia kultivovaného na definovaných médiích, nejčastěji na bramborovém a sladinkovém agaru (PDA, SDA; kapitola 3.6.2.) ve dvou shodných časových intervalech, nejčastěji 5-7 dní a 10-12 dní a za optimálních světelných a teplotních podmínek.

Obr. 34-40: Postup determinace kmenu fytopatogenní bakterie metodou Biolog GEN III

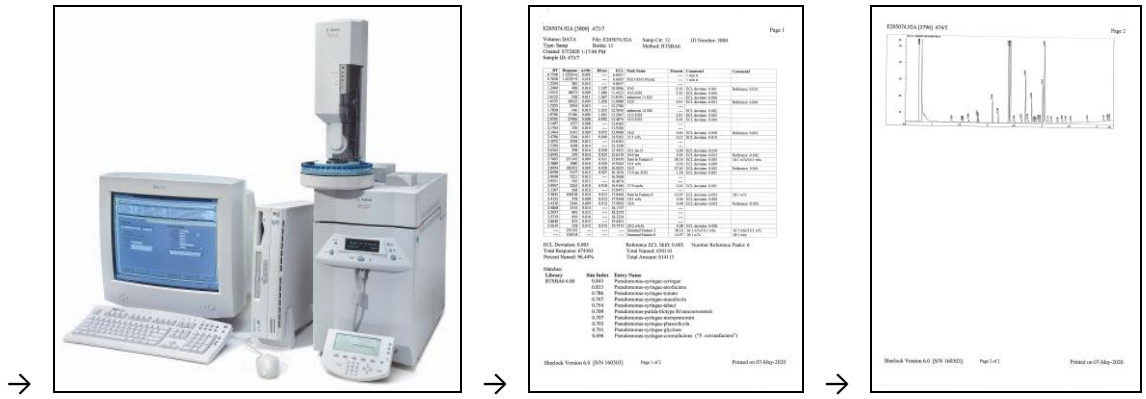


3.3.2. FAME

Druhou metodou vhodnou pro identifikaci bakteriálních a houbových kmenů je metoda založená na stanovení mastných kyselin C9-C20 a jejich množství v buňkách (obr. 41-49). Mastné kyseliny jsou převáděny esterifikací na těkavé methylestery, které jsou pak separovány při specifické teplotě na speciální koloně HP-ULTRA 2 v plynovém chromatografu 6850 Series II (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Typ kyseliny a její množství se hodnotí v plamenově ionizačním detektoru (FID) a převádí na elektrický signál. Počet uhlíků dané mastné kyseliny (typ kyseliny) se hodnotí podle retenčního času na detektoru (r_t). Typ kyseliny lze odečíst podle vzdálenosti elektrického signálu od bodu 0 na časové ose x. Čas, za který projde methylester určité kyseliny kolonou, je na kalibrované koloně konstantní. Kvantitativní analýza kyselin se vyhodnocuje podle počtu ionizovaných částic na FID, který převádí elektrický signál. Výška píkuse odečítá na ose y. Suma typů mastných kyselin a jejich množství se porovnává v systému SHERLOCK se zvolenou databází. Pro identifikaci původců korových nekróz a epifytní mikroflóry teplomilných peckovin jsou vhodné knihovny pro bakterie TSBA6 a RTSBA6, ACTIN6, pro houby FUNGI. Kmen bakterie je identifikován, pokud je podobnost s entitou v databázi větší než 50 %, Sim Index ≥ 0,5 a vzdálenost od profilu mastných kyselin další nejbližší entity DIST ≥ 5,0. Bakteriální kmeny jsou 24 h kultivovány na médiu King B nebo MPAg (kapitola 3.6.2) při teplotě 28°C. Cca 5µl klička bakteriální kultury se rozpustí ve zmýdelňovacím roztoku (kapitola 3.6.3.). Potenciální fytopatogenní houby jsou kultivovány v 50 ml tekutého SDA bujónu (kapitola 3.6.2.) za neustálého promíchávání na třepačce při cca 150-200 rpm po dobu 48-72 h při 28°C. Nárůst kultury se hodnotí dle zákalu. Bujón se přilije do sterilní 50 ml zkumavky a centrifuguje 10 minut při 5000 g. Vzhledem k nízkému obsahu mastných kyselin se celý pelet přenese do skleněné 10 ml zkumavky a přidá se zmýdelňovací roztok (kapitola 3.6.3.). Další postup přípravy methylesterů mastných kyselin a vyhodnocení jejich spektra je shodný s postupem u potenciálních bakteriálních patogenů. Proces zmýdelnění, esterifikace mastných kyselin a jejich extrakce z roztoku probíhá podle doporučeného postupu MIDI (MIDI, Inc. Newark, DE, USA) a není proto v metodice podrobně popisován.



Obr. 41-46: Postup determinace kmenu fytopatogenní bakterie metodou FAME



Obr. 47-49: Postup determinace kmenu fytopatogenní bakterie metodou FAME

3.3.3. PCR

3.3.3.1. Extrakce DNA

DNA se extrahuje z mikrobiálních kmenů, extraktů nebo macerátů pletiv. V případě extrakce DNA z bakteriálních kmenů se kmeny kultivují 24 h na živném médiu King B při teplotě 25-28°C a následně se připraví suspenze o koncentraci 10^8 buněk/ml (A_{620nm}=0,1) ve sterilní sdH_2O. Kultura patogenní nebo nepatogenní houby se kultivuje v tekutém médiu SAD 2 dny při teplotě 25-28°C. Zakalené médium se centrifuguje 10 min. při 4500 g. DNA z bakteriální suspenze nebo mycelia v peletu se následně uvolní rychlometodou, tj. 5 min. povařením nebo pomocí speciálních komerčních kitů (Qiagen DNeasy Plant Mini kit, Qiagen, Germany; GeneAll Plant SV Mini kit, Incheon, Korea). Při izolaci se vychází z doporučeného komerčního postupu. Oproti doporučenému návodu se prodlužují doby centrifugace a inkubace ve všech případech o 30 s až 1 min. s cílem zvýšit výtěžnost DNA. Při testování přítomnosti potenciálních bakteriálních patogenů v extraktech a macerátech se DNA nejčastěji izoluje pomocí kitu Qiagen DNeasy Plant Mini kit. Pozitivní kontrolou je DNA uvolněná povařením nebo izolovaná pomocí kitů ze sbírkových kmenů zastupujících patovary *Ps* významné pro teplomilné peckoviny - *Ps.* pv. *syringae* CCM 4073 (Czech Culture Collection), CCM 2868*,* CCM 2870, LMG 1247 (BCCM/LMG Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms) a *Pseudomonas amygdali* pv. *morsprunorum* LMG 5051 a *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* LMG 5184. Pozitivními kontrolami jsou patovary *Ps* kultivované za stejných podmínek jako izolované kmeny. Pozitivní kontrolou je DNA izolovaná dle stejných protokolů jako u vzorků z bakteriální suspenze sbírkových kmenů o koncentraci 10^8 buněk/ml (A_{620} = 0,1). Negativní kontrolou je sdH_2O a extrakt z listových pupenů meruňky prostých patogenu. Negativní kontrola se zpracovává a ředí stejně jako vzorky.

V případě testování přítomnosti bakterií rodu *Phytoplasma* se dosáhne největší výtěžnosti při extrakci DNA kitem SynergyTM 2.0 Plant DNA Extraction Kit (OPS Diagnostics, USA) nebo podle modifikovaného CTAB (cetyl trimethylamonium bromidem) protokolu (Sambrook and Russell, 2006; Jarausch et al., 2011; kapitola 3.6.4.). Orientační koncentrace DNA se stanoví nanofotometrem (NanoPhotometer® P-Class, Implen, Germany). Izolovaná DNA se uchovává při teplotě minimálně -20°C a nižší. Jako externí pozitivní a negativní kontrola správné izolace se využívá komerční DNA (Loewe Biochemica, Darmstadt, Germany). Ředění se řídí doporučením firmy pro real-time PCR. Negativní kontrolou amplifikace PCR je sdH_2O. Pro kontrolu cílené amplifikace se může zařadit i interní pozitivní kontrola, která se musí kontrolovat u každého vzorku. PCR reakce se obohacuje například o primery amplifikující nespecifickou, například eukaryotickou 18S rDNA obsaženou v DNA vzorku, nebo přídavek syntetické sekvence do DNA vzorku odlišné od sekvence stanovovaného patogenu.
V případě houbových patogenů se kmeny kultivují na médiu PDA 10-14 dnů při 22-25°C ve tmě. DNA se izoluje z vzdušného mycelia kitem DNeasy® Plant kit (Qiagen, Germany) nebo metodou CTAB (kapitola 3.6.4.1.). Orientační stanovení koncentrace, uchovávání izolované DNA a příprava kontrol je shodná s výše uvedeným postupem pro bakterie. Pozitivní kontrolou při příznacích Eutypa diebak je kmen *Eutypa lata* isolate CBS 101932 (Centraalbureau voor Schimmelcultures). Pozitivní kontrolou při příznacích označovaných jako brown rot disease jsou kmeny *Monilinia laxa* ATCC 66106 (meruňka, Španělsko) a ATCC 9961 (meruňka, neznámý původ), *Monilinia fructigena* CBS 494.50 (třešeň, Holandsko), *Monilinia fructicola* ATCC 42248 (American Type Culture Collection, broskvoň, Nový Zéland), ATCC 46606 (broskvoň, USA) a *Monilia polystroma* CBS 102688 (jabloň, Japonsko).

3.3.3.2. Real-time PCR

Pro identifikaci bakteriálních původců korových nekróz z *P. syringae* komplexu je seznam primerů, velikostí amplifikačních produktů, optimalizovaných protokolů real-PCR pro Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, Germany) s využitím nespecifické barvy RT2 SYBR® Green qPCR (Qiagen, Germany) a odpovídajících odkazů uveden dle mikroorganismu v kapitole 3.6.5. (Tabulka 1, 2, 3). Amplifikace části konstitutivních nebo nekonstitutivních genů potenciálních patogenů v extraktech se vyhodnocuje minimálně pro dvě koncentrace DNA (konc., 10^{-1}) a pro tři koncentrace neupravené bakteriální suspenze v rozmezí 10^6-10^3 buněk/ml.
Pro Phytoplazma *'Ca. P. prunorum'* v prvním kroku real-time PCR metody probíhá pre-amplifikace rDNA s primery zahrnujícími sekvenci celé 16S rDNA (Christensen et al., 2013) nebo celé 23S rDNA (Hodgetts et al., 2009) pro širší spektrum fytoplazmem na dřevinách. Po pre-amplifikaci je 1-2 µl PCR produktů použit jako

templát v PCR reakci se specifickými primery ESFY-f/ ESFY-r (Mehle et al., 2013; kapitola 3.6.6., Tabulka 4 až 6) pro fytoplazmu *Ca. P. prunorum*.
K identifikaci a rozlišení čtyř původců hnědé houbové hniloby z rodu ***Monilinia*** je validována metoda van Brouwershaven et al. (2010), Mon 139F/Mon 139R se sondou P_fc pro identifikaci *M. fructicola* a sondou P_fg/1x/ps pro identifikaci zbývajících tří druhů (kapitola 3.6.7., Tabulka 11-13).
Vyhodnocení výsledků amplifikace se u metody real-time PCR provádí podle hodnoty c_t - cycle threshold - počet cyklů, za který fluorescenční signál překročí hranici fluorescenčního pozadí v reálném čase. Obecně je hodnota c_t při pozitivním výsledku pro rozdílné bakteriální patogeny ≤ 33; pro houbové patogeny a fytoplazmy $c_t < 40$. Po ukončení amplifikace se vyhodnocuje kvalita produktů amplifikace. Produkty PCR se hodnotí podle t_m – mealting point – teploty denaturace produktů PCR. Při správně zvolených primerech a čisté výchozí DNA amplifikační produkty jedné reakce PCR tají při jedné teplotě. Hodnoty c_t a t_m se hodnotí v porovnání s pozitivními a negativními kontrolami pro daný patogen.

3.3.3.3. Konvenční a nested PCR

Vzhledem k náročnosti identifikace a rozlišení některých druhů zejména fytopatogenních hub a fytoplazem nejsou doposud ani pro všechny fytokaranténní činitele validovány metody real-time PCR. Identifikace těmito metodami je časově a přístrojově náročnější. Pro vyhodnocení výsledků amplifikace vyžaduje elektroforetickou separaci a vizualizaci produktů PCR (kapitola 3.6.8.). Dosažení dostatečné koncentrace u fytoplazem vyžaduje pre-amplifikaci sekvence společné pro všechny fytoplazmy. Pro identifikaci houbových patogenů se používají dvě koncentrace DNA izolované z houbového mycelia v rozmezí 10-50 ng a DNA extrahovaná z rostlinného pletiva, tenkých plátků terminálních větví a letorostů, řapíků a plodů ředěná 1:10 a 1:50.
Pro identifikaci **Phytoplazma *'Ca. P. prunorum'*** je validována vedle real-time PCR i metoda klasické a nested PCR. Více validovaných metod minimálně umožňuje kritické porovnání výsledků různých metod, které využívají k identifikaci odlišné genetické sekvence patogenu. Klasická metoda PCR zahrnuje dva kroky. V prvním kroku zahrnuje amplifikaci 16S rRNA širší skupiny fytoplazmem s primery fU5/rU3 (Lorenz et al., 1995, kapitola 3.6.6., Tabulka 7-9). V druhém kroku metodou RFLP 4h při 37°C (kapitola 3.6.6., Tabulka 10) probíhá štěpení produktů PCR s restrikčními endonukleázami *Ssp*I, *Bsa*AI, *Rsa*I. Elektroforézou se podle velikosti fragmentů rozliší fytoplazmy *Candidatus* Phytoplasma mali (*Ca.* P. mali), *Ca.* P. pyri a cílené *Ca.* P. prunorum. Elektroforéza probíhá za shodných podmínek jako kontrola produktů real-time PCR (kapitola 3.6.8.). Sledovaná fytoplazma *Ca.* P. prunorum jako jediná tvoří při štěpení endonukleázou *Rsa*I fragment o velikosti

351 a 392 bp a při štěpení *Bsa*AI jako jediná tvoří fragment o velikosti 452 bp (Schneider et al., 1995).
U nested PCR zahrnuje identifikace *Ca.* P. prunorum tři kroky. V prvním kroku se pre-amplifikuje skupina fytoplazem *Ca.* P. mali s primery P1/P7 konvenční metodou PCR (Schneider et al., 1995). V druhém kroku metodou nested PCR probíhá amplifikace se specifickými primery fO1/rO1 (Lorenz et al., 1995, kapitola 3.6.6., Tabulka 7-10). Metodou RFLP se výsledné produkty nested PCR štěpí třemi restrikčními endonukleázami. Sledovaná fytoplazma *Ca.* P. prunorum jediná tvoří při elektroforéze po štěpení endonukleázou *Rsa*I fragment o velikosti 392 bp a při štěpení *Bsa*AI fragment o velikosti 452 bp (Schneider et al., 1995). Druhou možností identifikace jednotlivých fytoplazem je sekvenace produktů nested PCR.
Pro rozlišení houbových patogenů ***Monilinia* spp.** je doporučována konvenční PCR (Ioos and Frey, 2000; Bulletinu 39, 2009; kapitola 3.6.7., Tabulka 11-13) včetně ***M. laxa*** vyvolávající náhlé vadnutí. Validovaná je také multiplex konvenční PCR metoda na rozlišení všech čtyř druhů (Côté et al., 2004).
Pro další houbový patogen ***Eutypa lata*** jsou pro konvenční PCR využívány specifické primery primárně určené pro identifikaci patogenu v pletivech révy vinné a jeho odlišení od dalších houbových patogenů (kapitola 3.6.7., Tabulka 14-16). Pro *E. lata* v pletivech zejména meruňky jsou relevantní dvě dvojice primerů Lata 1/Lata 2-2 (*E. lata* ITS regions, Lecomte et al., 2000) a EL1/EL4 (*E. lata* ITS regions, Catal et al., 2007) po předchozí pre-amplifikaci pomocí universálních primerů ITS1F/ITS4 .

3.3.3.4. Elektroforéza

Typ PCR produktů nebo fragmenty štěpení RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů) lze analyzovat real-time horizontální elektroforézou (runView, Cleaver Scientific Ltd., Rugby, UK) při 80 V v 2 % agarózovém gelu (pro 100-3000 bp, příprava 3.6.8.) s přídavkem Midori Green DNA Stain 3 µl/100 ml gelu (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) v rozmezí 5-10 µl/jamku. Do krajních jamek gelu se nanáší 3-5 µl DNA bp standard (ladder) jeho volba se řídí očekávanou velikostí amplikonů. Do jamek se nanáší 8-12 µl směsi produktů PCR nebo fragmentů štěpení. Elektroforéza probíhá v prostředí pufrů, např. TBE (kapitola 3.6.8.) 30-120 min. Separaci produktů je možné ihned po spuštění elektroforézy vizualizovat pod modrým zářením (470 nm) a regulovat tak průběh elektroforézy. Vyhodnocení elektroforetické separace probíhá na agarózovém gelu porovnáním s PCR produkty nebo fragmenty štěpení pozitivních a negativních kontrol a DNA bp standardem. Pro většinu separovaných směsí v rámci determinace patogenů teplomilných peckovin postačují DNA standardy v rozmezí 50-1200 bp (např. PCR 100 bp Low Marker, 100-1000 bp, Sigma, USA) s definovanou velikostí

jednotlivých fragmentů. Hodnotí se velikost PCR produktu nebo fragmentu štěpení podle počtu párů bází (bp) dle DNA bp standardu (ladder) a přibližná kvantita podle tloušťky proužku.

3.4. Stanovení fytopatogenních vlastností

Výsledky determinačních metod musí být ukončeny biologickým testem a reizolací kultivovatelných patogenů a výjimečně vyvoláním specifických příznaků po inokulaci fytoplazem.
Fytopatogenní vlastnosti u potenciálních bakteriálních patogenů jsou ověřovány v testu hypersensitivity na rostlinách tabáku. Pozitivní kmeny jsou dále testovány na výhonech a semenáčích meruňky a broskvoně. Vyhodnocují se i jejich kompetitivní vlastnosti a schopnost bakteriálních kmenů přispívat k mrazovým poškozením rostlin – INA aktivita.

3.4.1. Test hypersenzitivity na tabáku

Z 24 h staré bakteriální kultury se připraví suspenze o koncentraci 10^5 - 10^6 buněk/ml ve sterilní vodě. Rostliny tabáku se před inokulací 24 h nezalévají. Test se provádí při pokojové teplotě. Suspenze se pod tlakem vpraví do mezižilkového pletiva listových čepelí nebo injikuje přímo do žilek v listu. Jako negativní kontrola se používá sterilní voda a jako pozitivní kontrola suspenze virulentního bakteriálního kmene *P. syringae*. Výsledek se vyhodnocuje 24-48 h po infiltraci. Pokud je infiltrovaný kmen virulentní, listy v místě inokulace vadnou a vytvářejí se žluté až černé nekrotické léze (obr. 50). V extrémním případě dochází k vadnutí části rostliny. Pozitivní kmeny jsou dále testovány na mladých rostlinách fazolu, výhonech a semenáčích meruňky a broskvoně.

Obr. 50: Hypersenzitivní reakce izolátu fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* na listu tabáku

3.4.2. Test patogenity na mladých rostlinách bobu nebo rajčete

Kmeny pozitivní v testu hypersenzitivity se dále testují na mladých rostlinách bobu obecného (*Vicia faba* L.), lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Z 24 h staré bakteriální kultury se připraví suspenze o koncentraci 10^5 - 10^6 buněk/ml ve sterilní vodě. Rostliny se inokulují ve fázi dvou pravých listů, 24 h před inokulací se nezalévají. Suspenze testovaných kmenů se inokulují do stonků rostlin. Jako negativní kontrola se používá sterilní voda a jako pozitivní kontrola suspenze virulentního bakteriálního kmene *P. syringae*. Rostliny se vyhodnocují po dobu 2-3 týdnů. Pokud je inokulovaný kmen virulentní, vytváří se kolem místa vpichu léze, v jejím okolí vadnou a zasychají listy. Celé rostliny vadnou i při minimálním vodním stresu. V extrémním případě vadnou a usychají části nebo celé rostliny.

3.4.3. Test patogenity na výhonech meruňky a broskvoně

Detašované výhony z neošetřovaných stromů meruňky a broskvoně o délce cca 30-40 cm se co nejrychleji po nastříhání rozdělí po třech kusech do nádob s vodou a inokulují se testovanými kmeny. Inokulace probíhá v růstové komoře při denní teplotě 20-22°C, noční teplotě 15-17°C, délka dne je 16 h. Pro každý kmen se připraví z 24 h staré bakteriální kultury suspenze o koncentraci 10^6 buněk/ml ve sterilní vodě. Do suspenze se přidá 0,2 ml Tweenu 20. Na kontrolní výhony se aplikuje voda, 3-5 výhonů se ponechává bez zásahu. Všechny rostliny, kromě neošetřených, se na 24 h překryjí polyethylenovým obalem. Po uplynutí této doby se obaly odstraní. Provádí se vizuální hodnocení po dobu 10-15 dnů. Hodnotí se rychlost tvorby a počet nekróz na listech a jejich vadnutí v porovnání s neošetřenou a negativní kontrolou (obr. 51-54). Podle vitality výhonů se po 10-15 dnech na kompetitivní test odebírají listy s příznaky a bez příznaků.

Obr. 51-54: Patogenní reakce na detašovaných výhonech a listech meruňky (vlevo) a broskvoně (vpravo) po aplikaci fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*

3.4.4. Test patogenity na semenáčcích teplomilných peckovin

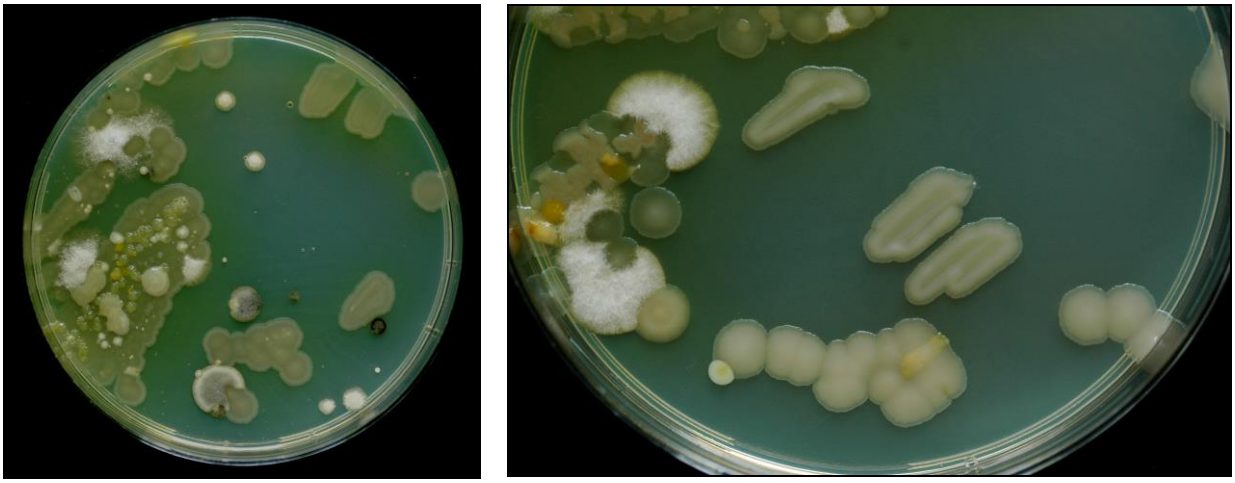
Ve skleníku se napěstují 3-6 měsíční semenáčky meruňky a broskvoně. Část semenáčků se v měsíci březnu přemístí do síťovníku, přibližně jeden měsíc před aplikací postřiku. Pro každý pozitivní kmen v testu hypersenzitivity a testech patogenity na výhonech meruňky a broskvoně se připraví z 24 h staré bakteriální kultury suspenze o koncentraci 10^5 buněk/ml ve sterilní vodě. Do suspenze se přidá 0,2 ml Tweenu 20. Semenáčky se 24-48 h před aplikací nezalévají. Suspenze se aplikuje současně ve skleníku a síťovníku, každý izolát minimálně na dvě rostliny ve skleníku a v síťovníku. Na kontrolní rostliny se aplikuje voda. Pro aplikaci venku je ideální bezvětří a oblačné počasí. Rostliny se na 24 h překryjí polyethylenovým obalem. Po uplynutí této doby se obaly odstraní a semenáčky se zalijí. Následně se provádí pouze pravidelná zálivka a vizuální hodnocení v týdenním intervalu. Hodnotí se rychlost tvorby a počet nekróz na listech, jejich vadnutí, případně tvorba vodnatých lézí na větvích a celková vitalita semenáče (obr. 55). V měsíčních intervalech po dobu 1 roku se hodnotí přítomnost patogenu v epifytní mikroflóře, jeho schopnost pronikat přes poranění do vnitřních pletiv rostliny a přezimovat v jizvách po listech a korových nekrózách. Přítomnost v epifytní mikroflóře a korových nekrózách se hodnotí stejně jako u vzorků odebraných v produkčních sadech. Odběr a zpracování je popsáno v kapitole 3.1. a 3.2., kmeny jsou determinovány metodou Biolog (kapitola 3.3.1.) a ověřeny v testu hypersenzitivity (kapitola 3.4.1.).

Obr. 55: Zasychající vrcholová část letorostu meruňky
po inokulaci bakterií *Pseudomonas syringae*

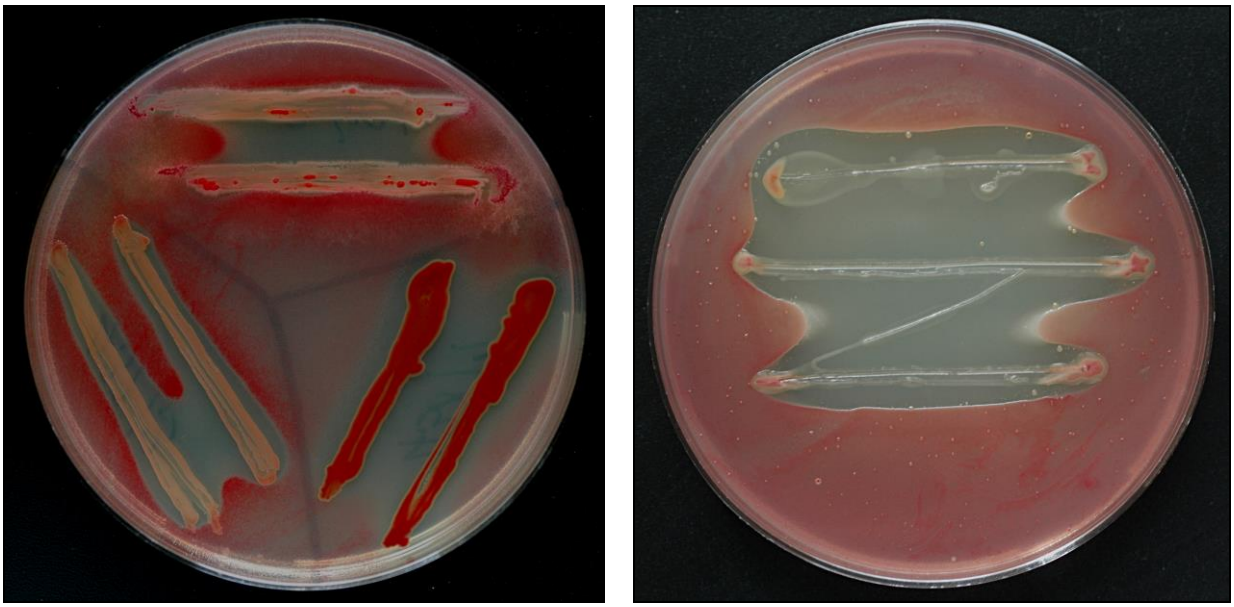
3.4.5. Kompetitivní test

Přežívání a vitalita inokulovaného kmene v epifytní mikroflóře výhonů a na semenáčcích genotypů meruňky a broskvoně se hodnotí 10-15 dní po jejich inokulaci. Odběr listů a zpracování je popsáno v kapitole 3.1. a 3.2. Každý smyv z listů se po 10 µl nanáší na dvě Petriho misky s živným médiem King B (kapitola 3.6.2.). Celkový nárůst bakteriálních kolonií a poměrné zastoupení inokulovaného

kmene v porovnání s počtem a zastoupením ostatních epifytních entit se hodnotí po 2-5 dnech. Vyhodnotí se kvalitativní a kvantitativní odchylky od smyvu z listů z neošetřených výhonů a výhonů ošetřených vodou s Tweenem 20. Variantní metodou je stěr epifytní mikroflóry tampónem. Nasbírané bakterie se uvolní do 1,0-1,5 ml sterilní sdH_2O, nanáší se stejným tamponem formou křížového roztěru na Petriho misky s živným médiem (obr. 56, 57, 58). Vyhodnocování probíhá stejně jako u smyvu z odstřižených listů. Roztok lze využít i k izolaci DNA a analýze některou z metod PCR.



Obr. 56, 57: Křížový roztěr smyvu epifytní mikroflóry do sterilní destilované vody na živném médiu



Obr. 58: Antibiotické zóny bakteriálních izolátů získaných z epifytu meruňky vytvořené na živném médiu kontaminovaném původci bakteriální korové nekrózy

3.4.6. Testování patogenity fytoplazem

Testování patogenity fytoplazem se vzhledem k časové náročnosti běžně neprovádí. Semenáčky nebo mladé stromky peckovin se inokulují roubováním pozitivně testovaného štěpu. Stromky se sledují v porovnání se zdravou kontrolou 3-4 roky, semenáčky ve skleníku minimálně 3-6 měsíců.

3.4.7. Testování patogenity u potenciálních houbových patogenů

Testování patogenity *Eutypa lata, Monilinia laxa* a dalších houbových patogenů je časově náročné. Provádí se ve skleníku nebo v polních podmínkách. Ve skleníku se inokulují semenáčky meruněk, v polních podmínkách ideálně mladé stromky pro rychlejší dosažení výsledků. U tenkých semenáčků se pouze poškodí povrchová pletiva stonku a na odhalená korová pletiva se skalpelem nanese z média PDA 14-30 denní mycelium. Místo inokulace se zakryje parafinem. U stromků se pouze nařízou povrchová pletiva a pod ně se vloží cca 1 cm^2 segment agaru s myceliem. Místo poranění se opět překryje parafinem. Semenáčky i mladé stromky se hodnotí v měsíčních intervalech. Doba trvání testu je nejméně 3-6 měsíců ve skleníku a jednu vegetační sezónu v polních podmínkách. Hodnotí se rychlost tvorby lézí a velikost lézí. Reizolace patogenu se provádí po 3-12 měsících z okrajů léze shodně jako v kapitole 3.2. Zpracování vzorků, izolace a kultivace kmenů bakterií a hub.
Patogenitu *M. laxa* lze testovat na plodech meruňky. Na dozrávajícím plodu se po povrchové dezinfekci sterilním skalpelem nařízne na 2-3 místech (dle velikosti plodu) ve tvaru písmene U cca 1-2 cm^2 slupky. Mezi slupku a dužninu se umístí segment s vyzrálým myceliem. Plody se umístí do uzavřeného kontejneru. Po 5-7 dnech se pokus vyhodnotí. Hodnotí se velikost a rychlost tvorby hnilobné hnědě zabarvené léze. Patogen se reizoluje z okrajové části léze na PDA médium (kapitola 3.6.2.) a determinuje podle makro a mikroskopických charakteristik nebo metodou PCR.

3.5. Nukleační aktivita fytopatogenních a dalších kompetitivně významných epifytních bakterií

Část bakteriálních původců korových nekróz a některé epifytní bakterie přispívají i k předčasné tvorbě nukleačních jader. Nukleační aktivita bakteriálních kmenů se stanovuje v kryostatu (obr. 59) v etylalkoholové lázni (≤ 95 %). Pro každý kmen se z 24 h staré bakteriální kultury připraví suspenze o koncentraci 10^6 – 10^8 buněk/ml ve sterilní sdH_2O. Jako kontrola se používá sdH_2O voda. Zkumavka s 5 ml bakteriální suspenze se v etylalkoholové lázni vychladí na výchozí teplotu 0°C. Po 30 minutách se začne teplota v pravidelných půlhodinových intervalech snižovat o 0,5°C. Zmrzlé suspenze se po uplynutí 30 min. při dané teplotě vyřadí.

Teplota se postupně snižuje až do -8°C. Teplota mrznutí suspenze se stanovuje ve dvou opakováních a ve dvou koncentracích. Nukleační aktivní kmeny mrznou do teploty -4°C.

Obr. 59: Ledová nukleační aktivita bakteriálního izolátu při teplotě -3,2°C ve zkumavce (vpravo) v porovnání s kontrolní variantou sdH_2O (vlevo)

3.6. Metody, roztoky, média a jejich příprava

3.6.1. Zpracování vzorků rostlinných pletiv

Macerační a extrakční pufr

K_2HPO_4 x $3H_2O$	22,0 g	
KH_2PO_4	4,1 g	
sacharóza	100,0 g	
polyvinyl pyrrolidon (PVPK15, MW 10 000)		20,0 g
BSA (bovinní sérový albumin)	1,5 g	
destilovaná voda	1000ml	
pH (25°C)	7,6	

před použitím přidat na 200 ml pufru 1,1 g kyseliny askorbové
uchování v lednici při teplotě 4°C do druhého dne

3.6.2. Izolace, kultivace

King B - kultivace bakterií

kvasniční extrakt	10,0	g
glycerin	3,0	g
K_2HPO_4	0,4	g
Na_2HPO_4	0,4	g
glukóza	2,0	g
agar	12,0	g
destilovaná voda	1000	ml
pH (25°C)	6,8-7,2	
autoklávovat 20 min při 121°C		

Potato Dextrose agar (PDA) - kultivace patogenních a nepatogenních plísní

dextróza	20,0	g
bramborový extrakt	4,0	g
agar	15,0	g
destilovaná voda	980	ml
pH (25°C)	5,4-5,8	
autoklávovat 20 min při 121°C		
vychladit na 50°C a přidat		
chloramphenicol	25 mg v 10 ml sterilní vody	
chlortetracycline	40 mg v 10 ml sterilní vody	

Sabouraud Dextrose bujón (SDA) - kultivace patogenních a nepatogenních plísní

glukóza	40,0	g
pepton	10,0	g
destilovaná voda	1000	ml
pH (25°C)	5,4-5,8	
autoklávovat 20 min při 121°C		

3.6.3. FAME

Zmýdelňovací směs

NaOH (ACS grade)	45,0	g
CH_3OH	150,0	ml
deionizovaná voda	150	ml

3.6.4. Izolace DNA

Modifikovaný CTAB postup izolace DNA

1. Extrakt obohacený o fytoplazmy se zkoncentruje v předchlazené centrifuze za 20-25 min při 9500g.
2. Pelet se resuspeduje v 1 ml extrakčního CTAB pufru předehřátém na teplotu 60°C a inkubuje 10-30 min. ve vodní lázni při teplotě 60°C.
3. Lyzát se smíchá se směsí chloroform/isoamyl alkohol (24:1, v/v) a protřepává 5 min.
4. Lyzát se centrifuguje 10 min. při 7 600g.
5. Pelet se promíchá s 1,5 ml 70% ethylalkoholu vychlazeným na teplotu -20°C.
6. Směs se protřepává 1 min.
7. Směs se zcentrifuguje 5 min při 10 500 g.
8. Supernatant se opatrně slije a centrifugace se opakuje 10 min při 13 900g.
9. Supernatant se opatrně slije a pelet se rozpustí v 100 µl TE pufru (No. 786, G-Biosciences, USA; 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).
10. Vyizolovaná DNA se uchovává min. při teplotě -20°C.

Extrakční pufr (CTAB Extraction Buffer Product No. CEB 500-02, OPS Diagnostics, USA)
nebo připravit:

hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	2,5	g
polyvinyl pyrrolidone (PVPK30, MW 40 000)	1,0	g
NaCl (28 ml 5M NaCl)	8,2	g
ethylen diamintetraoctan disodný (4 ml 0, 5M EDTA Na_2)	0,7	g
TRIS (10 ml 1 M TRIS)	1,2	g
sterilní destilovaná voda	100	ml
pH (25°C)	8,0	
před použitím přidat 0,2 ml 2-merkaptoethanolu		
skladovat při pokojové teplotě max. 2 dny		

3.6.5. PCR - bakterie

Tabulka 1: Specifické primery pro identifikaci bakterií z komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR

Primery pro real-time PCR	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c(µM) V(µl/reakci)	Literatura
B1/B2 (syringomycin synthesis)	5´-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3´ 5´-TCGATTTTGCCGFGATGAGTC-3´	60	752	10 µM /2 µl	Sorensen et al., 1998
HrpL1/HrpL2 (Ps. syringae) A7/A8	5´-TTGGCTAGGTATCGCTATGC-3´ 5´-AGGACCCAGTTTTGGAGTGC-3´	52	600	10 µM /1 µl	Alfano et al., 1996
SyD1/SyD2 (syringom. secretion)	5´-CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC-3´ 5´-TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC-3´	60	1040	10 µM /2 µl	Bultreys and Gheysen, 1999
PsyF/PsyR (Pseud. syringae)	5´-ATGATCGGAGCGGACAAG-3´ 5´-GCTCTTGAGGCAAGCACT-3´	61	144	10 µM /1 µl	Guilbaud et al., 2016
PG1Fw/PG1Rv	5´-AGAACTTCTGTTGCTGACAGTACG-3´ 5´-CAATACCGTCATCGCGCTGGACA-3´	63	321	10 µM /2 µl	Borschinger et al., 2016
PG2Fw/PG2Rv	5´-AGCAGCGATTTATTTTGTCTTGA-3´ 5´-ATGATCGCGTACCTGATGTC-3´	60	341	10 µM /2 µl	Borschinger et al., 2016
PG3Fw/PG3Rv	5´-AAGCGTGCCAAAGAGCTTCT-3´ 5´-ATGATCGCGTACCTGATGTC-3´	61	837	10 µM /2 µl	Borschinger et al., 2016
PG4Fw/PG4Rv	5´-CACCTGACTTACTGATCAAT-3´ 5´-ACAGGCACGCATATATCGTT-3´	60	845	10 µM /2 µl	Borschinger et al., 2016
shcFw/shcRv (PG7 and PG8)	5´-CGACCTGCTTTCGATCA-3´ 5´-TCAATACTCTGGAGATCAG-3´	54	850	10 µM /2 µl	Bartoli et al., 2014

Primery pro sekvenaci	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c(µM) V(µl/reakci)	Literatura
ctsFP/ctsRP	5'-AGTTGATCATCGA GGCGCWGCC-3' 5'-TGATCGGTTTGATC TCGCACGG-3'	56	480	10 µM /1 µl	Berge et al., 2014
rpoD-Fpc/rpoD-Rpsc	5'-AAGGCGARATCGA AATCGCCAAGCG-3' 5'-GGAACWKGCGCA GGAAGTCGGCACG-3'	63	445	10 µM /2 µl	Sarkar and Guttman, 2004
Cts-Fs	5'-CCCGTCGAGCTGCC AATWTTGCTGA-3'	58	487	0,1 µM /5 µl	Sarkar and Guttman, 2004
rpoD-Fs	5'-AAGCGTATCGAAG AAGGCATYCGTG-3'	53	452	0,1 µM /5 µl	Sarkar and Guttman, 2004

Tabulka 2: Reakční směs pro amplifikaci specifických úseků bakterií jednotlivých skupin komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR

Reagencie	1 reakce (µl)
kit pro Rotor Gene Sybr Green	12,0
primer F/primer R (10µM)	1,0-2,0/1,0-2,0
template DNA (vzorek)	2,0
sdH_2O	9,0-10,0
celkem	25,0

Tabulka 3: Cyklus pro amplifikaci specifických úseků bakterií jednotlivých skupin komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR

Operace	Teplota (°C)	Doba	Počet cyklů
počáteční denaturace*	95	5 min.	1
denaturace	92	30 s	
annealing	dle primerů	30 s	40
elongace	72	30 s	

3.6.6. PCR - fytoplazmy

Tabulka 4: Primery pro pre-amplifikaci dle (Christensen et al., 2004), (Hodgetts et al., 2009)* širšího spektra fytoplazem na dřevinách a následnou amplifikaci** fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' metodou real-time PCR

Primery pro konvenční a real-time PCR	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c(µM) V(µl/reakci)	Literatura
F	5'-CGTACGCAAGTATGAAACTAAAGGAT-3'	60	/	10 µM /0,3 µl	Christensen et al., 2004
R	5'-TCTTCGCAATTAAACAACATGATCCA-3'			10 µM /0,9 µl	
sonda	5'-FAM-TGACGGGACTCCGCACAAGCG-TAMRA-3'			2,5 µM /0,4 µl	
JH-F1*	5'-GGTCTCCGAATGGGAAAACC-3'	60	/	10 µM /0,3 µl	Hodgetts et al., 2009
JH-Fall*	5'-ATTTCCGAATCGGGGCAACC-3'			10 µM /0,3 µl	
JH-R*	5'-CTCGTCACTACTACCRGAATCGTTATTAC-3'			10 µM /0,3 µl	
SONDA JH-Puni*	5'-FAM-AACTGAAATATCTAAGTAAC-MGB-3'			2,5 µM /0,4 µl	
F**	5'-TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3'	60	/	10 µM /0,9 µl	Hodgetts et al., 2009
R**	5'-TCCACTGTGCGCCCTTAATT-3'			10 µM /0,9 µl	
ESFY sonda**	5'-FAM-CAAAATATTTATTTTAAAAAAACAAGCTC-MGB-3'			2,5 µM /0,4 µl	

Tabulka 5: Reakční směs pro pre-amplifikaci úseků specifických pro širší spektrum fytoplazem na dřevinách (Christensen et al., 2004), (Hodgetts et al., 2009)* a amplifikaci úseků specifických pro *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Hodgetts et al., 2009)** metodou real-time PCR

Reagencie	**1 reakce (µl) Christensen et al., 2004**	**1 reakce (µl) Hodgetts et al., 2009***	**1 reakce (µl) Hodgetts et al., 2009****
Taq DNA polymerasa	0,5	0,5	/
TaqMan PCR master mix	/	/	12,5
pufr+dNTPs	4+0,5	4+0,5	/
primer F (10 µM)	0,8	0,8	2,3
Primer F all*	/	0,8	/
primer R (10 µM)	0,8	0,8	2,3
sonda (2,5 µM)	0,9	1,0	0,9
template DNA (vzorek)	5,0	5,0	5,0
sdH_2O	12,0	11,6	2,0
celkem	25,0	25,0	25,0

Tabulka 6: Cyklus pro pre-amplifikaci úseků specifických pro širší spektrum fytoplazem na dřevinách dle Christensen et al., 2004 , Hodgetts et al., 2009* a amplifikaci úseků specifických pro *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Hodgetts et al., 2009) metodou real-time PCR

Operace	**Teplota (°C)**	**Doba**	**Počet cyklů**
iniciace	50	2 min.	
počáteční denaturace	95	10 min.	
denaturace	95	15 s	
annealing	60	1 min.	45 (40*)

Tabulka 7: Primery pro amplifikaci širšího spektra cytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci* širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci** fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou

Primery pro PCR	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c(µM) V(µl/reakci)	Literatura
fU5 rU3	5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3' 5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3	55	862	100 µM /0,2 µl 100 µM /0,2 µl	Lorenz et al., 1995
P1* P7*	5'-AGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	55	1850	10 µM /1,0 µl 10 µM /1,0 µl	Schneider et al., 1995
f01** r01**	5'-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3' 5'-AAGTGCCCAACTAAATGAT-3'	55	1100	1 µM /2 µl 1 µM /2 µl	Lorenz et al., 1995

Tabulka 8: Reakční směs pro amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci* širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci** fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou

Reagencie	1 reakce (µl) Lorenz et al. 1995	1 reakce (µl)* Deng and Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995	1 reakce (µl)** Lorenz et al., 1995
Taq DNA polymerasa	0,2	0,2	0,2
pufr+dNTPs+BSA	4+0,5+0,1	5+0,5+0,0	5,0+0,5+0,0
primer F (10µM)	2,0	1,0	1,0
primer R (10µM)	2,0	1,0	1,0
template (DNA, PCR produkt**)	5,0	2,0	2,0
sdH_2O	26,2	15,3	15,3
celkem	40	25	25

Tabulka 9: Cyklus pro amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci* širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci** fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou

Operace	Teplota (°C)	Doba	Cyklus	Teplota * (°C)	Doba *	Cyklus *	Teplota ** (°C)	Doba **	Cyklus **
iniciace	94	2 min.		94	2 min.		94	2 min.	
denaturace	94	20 s		94	1 min.		94	1 min.	
anneling	55	20 s	40	55	1 min.	36	55	1 min.	38
elongace	72	1 min.		72	1 min.		72	1 min.	
finální elongace	72	4 min.		72	8 min.		72	8 min.	

Tabulka 10: RFLP analýza produktů konvenční nebo nested PCR, identifikace fragmentů *Candidatus* Phytoplasma prunorum'

Reagencie Schneider et al., 1995	**1 reakce (µl) *Bsa*AI (Biolabs, Fermentas)**	**1 reakce (µl)* *Rsa*I (Promega, Fermentas)**
restrikční enzymový pufr 10x	2,0	2,0
restrikční enzym 10U/ µl	0,1	0,1
PCR konvenční nebo nested PCR produkt	12,0	12,0
sdH_2O	5,9	5,9
celkem	20	20
elektroforéza fragmentů po nested PCR (bp)	452	351 a 392
elektroforéza fragmentů po konvenční PCR (bp)	452	392

3.6.7. PCR - houby

Tabulka 11: Primery pro amplifikaci *Monilinia* spp. metodou real-time PCR – *Monilinia fructicola*, *M. fructigena**, *M. laxa**, *Monilia polystorma** a konvenční PCR**

Primery real-time a konvenční PCR	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c(µM) V(µl/reakci)	Literatura
Mon139F	5'- CAC CCT TGT GTA TYA TTA CTT TGT TGC TT-3'	60	140	10 µM /0,2 µl	Van Brouwershaven et al., 2010
Mon139	5'-CAA GAG ATC CGT TGT TGA AAG TTT TAA-3'			10 µM /0,2 µl	
P_fc	5'- FAM-TAT GCT CGC CAG AGG ATA ATT-MGBNFQ -3'			2,5 µM /0,2 µl	
P2_fg/lx/ps*	5'- VICAGT TTG RTT ATT CTC TGG CGA-MGBNFQ-3'			2,5 µM /0,2 µl	
ITS1-Mfc1 **	5'-TATGCTCGCCAGAGG ATAATT-3'	65	356	10 µM /0,3 µl	Ioos and Frey, 2000
ITS4Mfc1**	5'-TGGGTTT TGGCAGAAGC ACACT-3'			10 µM /0,3 µl	

Tabulka 12: Reakční směs pro amplifikaci specifických úseků fytokaranténní houby *Monilinia fructicola* metodou real-time PCR a konvenční PCR

Reagencie	1 reakce (µl) real-time PCR	1 reakce (µl) konvenční PCR
2X TaqMan Universal Master Mix	12,0	/
Taq DNA polymerasa	/	0,2
PCR pufr+dNTPs	/	5,0+0,5
primer F/primer R (10µM)	0,5/0,5	1,0/1,0
sonda	0,5	/
template DNA (vzorek)	5,0	5,0
sdH_2O	6,5	7,3
celkem	25,0	20,0

Tabulka 13: Cyklus pro amplifikaci specifických úseků fytopatogenních houby *Monilinia fructicola* metodou real-time PCR a konvenční PCR* metodou

Operace	Teplota (°C)	Doba	Počet cyklů	Teplota* (°C)	Doba*	Počet cyklů*
počáteční denaturace	95	10 min.	1	94	3 min.	
denaturace	95	15 s		94	30 s	
anneling	60	1 min.	40	63	30 s	35
elongace	72	30 s		72	60 s	
konečná elongace	/	/		72	10 min.	

hranice detekce pro real-time PCR $c_t < 40$

Tabulka 14: Specifické primery pro pre-amplifikaci a identifikaci *Eutypa lata* konvenční metodou PCR

Primery pro konvenční PCR	Sekvence	Hybridizační teplota (°C)	Velikost amp. úseků (bp)	Koncentrace c (µM) V(µl/reakci)	Literatura
ITS1F ITS4	5´- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3´ 5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´	55		10 µM /0,5 µl 10 µM /0,5 µl	Catal et al., 2007
EL1 EL4	5´- GACGCCTAAACTCTTGTTTTTCAGTGATTA-3´ 5´- AGGACGTCGACCGTAGCACACCTA-3´	60	503		Catal et al., 2007
Lata1 Lata2-2	5´- GAGCTACCCTGTAGCCCGCTG-3´ 5´- GACGTCAGCCGTGACACACC-3´	65	385	10 µM /0,5 µl 10 µM /0,5 µl	Lecomte et al., 2009

Tabulka 15: Reakční směs pro amplifikaci úseků specifických pro houbu *Eutypa lata* konvenční PCR

Reagencie	1 reakce (µl) ITS1F/ITS4	1 reakce (µl) EL1/EL4	1 reakce (µl) Lata1/Lata2-2
Taq DNA polymerasa	0,2	0,2	0,2
PCR pufr+dNTPs	4,5+0,3	4,5+0,3	4,5+0,3
primers F/R (10µM)	1,0/1,0	0,5/0,5	0,1/0,1
template DNA, PCR produkt* ITS1F/ITS4	3,0	2,0*	2,0
sdH_2O	15,0	17,0	17,8
celkem	25,0	25,0	25,0

Tabulka 16: Cyklus pro amplifikaci úseků specifických pro houbu *Eutypa lata* primery ITS1F/ITS4, EL1/EL4* a Lata1/Lata2-2** konvenční PCR

Operace	Teplota (°C)	Doba	Cyklus	Teplota * (°C)	Doba *	Cyklus *	Teplota ** (°C)	Doba **	Cyklus **
iniciace	94	2 min.		94	2 min.		94	2 min.	
denaturace	94	1 min.		94	1 min.		94	30 s	
anneling	50	30 s	30	62	30 s	35	65	30 s	38
elongace	72	1 min.		72	1 min.		72	1 min.	
finální elongace	72	5 min.		72	5 min.		72	5 min.	

3.6.8. Elektroforéza

Elektroforetický agar

- 2 % agarózový gel (2 g agarózy na 100 ml pufru TBE) pro 100-3000 bp
- za stálého míchání var 2 min.
- za stálého míchání ochlazení na 50-55°C
- za stálého míchání přidat 2-3 µl barviva Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Germany) na 100 ml agarózového gelu
- gelem naplnit elektroforetickou vanu s hřebenem
- po ztuhnutí lze uchovávat v lednici při teplotě 4°C v TAE pufru 2-3 dny

Elektroforetický pufr TBE 10x – zásobní roztok

Tris	54,0	g
kyselina boritá	27,5	g
Na_2EDTA	3,7	g
destilovaná voda	1000	ml

uchování při 4°C v lednici po dobu nejméně 3 měsíců

Elektroforetický pufr TBE 1x – pracovní roztok

100 ml TBE 10x – zásobní roztok
900 ml destilované vody
k okamžité spotřebě

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika „Detekce původců korových nekróz a předčasného odumírání meruněk a broskvoní, především bakterií komplexu *Pseudomonas syringae* v množitelských materiálech a v produkčních sadech.“ vychází z nových poznatků z průzkumu spektra patogenů získaných v průběhu několika let, včetně více jak ročního výzkumu v rámci projektu NAZV QK1920058 „Inovace integrované produkce teplomilného ovoce se zaměřením na zdravotní stav produkčních výsadeb a rozmnožovacího materiálu peckovin“ zabývajícího se touto problematikou. Kombinace dostupných identifikačních metod a epidemiologických znalosti povede k stanovení celého spektra a podílu majoritních původců předčasného odumírání teplomilných peckovin. Metodický postup zahrnuje metody determinace umožňující podchycení všech potenciálních původců kolapsu 3-8letých stromů teplomilných peckovin, především meruňky. Na základě uvedené metodiky a zvolených biochemických, chemických a molekulárně genetických metod lze identifikovat i další bakterie a houby s dosud

nepopsaným patogenním chováním na teplomilných peckovinách. Důraz je kladen především na spektrum bakteriálních patogenů, které:

1. pronikají do korových pletiv a vyvolávají tvorbu korových nekróz;
2. přispívají k mrazovým poškozením stromů v jarním období - INA^+ kmeny;
3. pronikají do cévních svazků, zamezují transportu vody a živin a způsobují celkový kolaps stromů;
4. přes vytvořená povrchová poškození umožňují vstup dalším patogenním mikroorganismům a škůdcům;
5. nelze účinně redukovat ochrannými přípravky, vzhledem k jejich malému spektru s vysokým rizikem vzniku rezistence;
6. nejsou v současnosti testovány v rozmnožovacích materiálech.

Metodika umožňuje testovat přítomnost patogenů jak v produkčních výsadbách, tak i ve výchozích množitelských materiálech, jak v rostlinných pletivech, tak i v epifytu. U všech bakteriálních patogenů je testována patogenita na výhonech a semenáčcích teplomilných peckovin. Novou a nejdůležitější fází testů patogenity je ověřování jejich kompetitivních schopností, tj. schopnosti přežívání, množení a kolonizace rostlinných pletiv mladých stromů. Tyto schopnosti rozhodují o reálném potenciálu patogenu způsobit kolaps stromů. Testování se provádí na výhonech a semenáčcích několika genotypů meruňky a broskvoně především v růstové komoře nebo skleníku v podmínkách optimalizovaných pro rozvoj patogenu.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Potřebnost a aktuálnost řešené problematiky je dána současným stavem produkčních výsadeb v České republice. Většina výsadeb není vyklučena na základě snížení produkce pod rentabilní úroveň vzhledem ke stáří stromů, ale z důvodu rostoucího počtu odumřelých stromů ve výsadbě, rostoucích nerentabilních dosadeb a náročnosti a nákladnosti péče o nevyrovnanou výsadbu. Stanovení spektra patogenů povede směrem k zemědělské praxi k doporučením na úpravu některých agrotechnických postupů v produkčních výsadbách. Doporučení směrem ke státní správě a výrobcům školkařských výpěstků se jednoznačně budou týkat minimálně namátkových kontrol výchozích roubových materiálů ze zahraničí i z tuzemska na spektrum zejména bakteriálních patogenů, které nejsou v současnosti zahrnuty do fytosanitárních pasportů.

Metodika je určena pro diagnostické laboratoře a výrobce stromků teplomilných peckovin. Pro pěstitele ovoce, Ovocnářskou unii a státní orgány Mze ČR a ÚKZÚZ může sloužit jako informační materiál shrnující potenciální původce předčasného odumírání, možnosti jejich diagnostiky a doporučení pro snížení ekonomických ztrát v produkčních výsadbách. Aplikace metodického postupu by měla přispět ke zvýšení možnosti záchytu patogenu v bezsymptomatických vzorcích rostlinných

pletiv s nízkou koncentrací patogenu. Metodika nepředkládá jednoduchý a rychlý návod eradikace původců předčasného odumírání teplomilných peckovin, ale metodické postupy k jejich odhalení, které umožní vyloučení systemicky infikované materiály z výroby školkařských výpěstků. Podle reálného podílu hlavního biotického faktoru na odumírání teplomilných peckovin v jednotlivých zemědělských provozech dojde i o adekvátní podíl ke snížení ekonomických ztrát.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zdravotní problémy v důsledku fytopatogenních činitelů se projevují v téměř 100 % produkčních výsadeb starších 5 let. Výroba sazenic z infikovaných oček vede k systemické infekci, která se obvykle projeví mezi 3. - 5. rokem po zapojení do výsadby. Přes vysokou kvalitu vyrobených školkařských výpěstků a snahu dodržovat fytosanitární opatření proti přenosu škodlivých činitelů při jejich výrobě dochází ke ztrátě podstatné části investice. Testování roubů na přítomnost původců korových nekróz a předčasného odumírání je nejefektivnější řešení, které dokáže nejrychleji a nejvíce zredukovat ztráty pěstitelů teplomilných peckovin. Vyloučení infikovaných roubů eliminuje jednoduchým testem, dle navržené metodiky, obrovské náklady spojené s výsadbou a péčí o mladé stromky, které odumřou, aniž by dosáhly plné produkce. Opatření proti jarním mrazům, redukce potenciálních bakteriálních a houbových patogenů a dalších bakterií zesilujících mrazová poškození stromů v epifytu jsou omezena řadou faktorů, které variabilně ovlivňují efektivnost provedených opatření (průběh počasí, virulence a rezistence patogenů, volba typu, koncentrace a načasování ochranného postřiku, genotyp peckoviny, apod.). Pěstování meruněk v ČR je rentabilní a perspektivní, zavedení vlastního testování na přítomnost škodlivých činitelů, které tak významně ovlivňují ekonomiku produkčních výsadeb je rychlé, jednoduché a nízkonákladové řešení. Vlastní testování výchozích materiálů je v zahraničí běžné. Vlastní testování všech vstupních materiálů se osvědčilo i u jiných rostlinných komodit. Zavedením technologie třístupňové kontroly veškerých vstupních šlechtitelských a množitelských materiálů (Pánková a Krejzar, 2017) došlo k eliminaci, vzhledem ke koncentraci v rostlinných pletivech, obtížně detekovatelného a na rostlinách bezsymptomatického škodlivého karanténního činitele s nulovou tolerancí, ze všech genetických *in vitro* materiálů. Podnik, kterému hrozila likvidace vysoce ziskové šlechtitelské sekce, je v současnosti pět let bez pozitivního nálezu karanténního činitele a získal zpět české i zahraniční obchodní partnery. Pěstování pod ochrannými sítěmi, zvýšená péče o zdrojové výsadby a důsledné testování je základem pro získání zdravých výchozích materiálů. Celkové odhadované náklady na základní otestování jednoho roubového materiálu se pohybují kolem 5 tis. Kč, proti ztrátě v desítkách tisíc Kč za předčasné odumření vyrobených stromků.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adams GC., Surve-Iyer RS. and Iezzoni AF., 2002. Ribosomal DNA sequence divergence and group I introns within the *Leucostoma* species *L. cinctum*, *L. persoonii*, and *L. parapersoonii* sp. nov., ascomycetes that cause Cytospora canker of fruit trees. Mycologia 94 (6): 947-967, DOI: 10.1080/15572536.2003.11833153

Bereswill S., Bugert P., Völksch B ., Ullrich M., Bender CL. and Geider, K., 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Applied and Environmental Microbiology 60 (8): 2924-2930.

Berge O., Monteil CL., Bartoli C., et al., 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. PLoS One 9, e105547.

van Brouwershaven IR., Bruil ML., van Leeuwen GCM. and Kox LFF., 2010. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. Plant Pathology 59: 548-555. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02220.x

Bultreys A. and Gheysen II., 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. Applied Environmental Microbiology 65: 1904–1909.

Catal M., Jordan SA., Butterworth SC. and Schilder AMC., 2007. Detection *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in grapevine by nested multiplex polymerase chain reaction. Phytopathology 97: 737-747.

Cieślińska M., 2011. European stone fruit yellows disease and its causal agent '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'. Journal of Plant Protection Research 51(4): 441-447.

Côté MJ., Tardif MC., and Meldrum AJ., 2004. Identification of *Monilinia fructigena, M. fructicola, M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease 88: 1219-1225.

EPPO, 2001. Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. EPPO Bulletin 31: 463-478.

EPPO, 2016. PM7/129(1) DNA barcodingas an identifcation toolfor a number of regulated pests. EPPO Bulletin 46: 501-537.

Gomila M., Busquets A., Mulet M., García-Valdés E. and Lalucat J., 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. Frontiers in Microbiology 8: 2422.

Guilbaud C., Morris CE., Barakat M., Ortet P. and Berge O., 2016. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. FEMS Microbiology Ecology 92, fiv146.

Hodgetts J., Boonham N., Mumford R. and Dickinson M., 2009. Panel of 23S rDNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. Applied Environmental Microbiology 75: 2945-2950.

Huang Y., Meng LL., Liu J. and Wang CX., 2019. First Report of Shoot Canker on Apricot Caused by *Botryosphaeria dothidea* in Shandong Province of China. Plant Disease 103 (11): https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0522-PDN.

Hughes KJD., Fulton CE., McReynold D. and Lane CR., 2000. Development of new PCR primers for identification of Monilinia species. EPPO Bull. 30: 507-511. https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00938.x

Chandler WA. and Daniell JW., 1976. Relation of pruning time and inoculation with *Pseudomonas syringae* van Hall to short life of peach trees growing on old peach land. Horticulturae Science 11: 103-104.

Christensen NM., Nyskjold H. and Nicolaisen M., 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quatification. In: In: *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology,* vol.938 (Ed. Dickinson M and Hodgess JR), pp. 245-252. Springer Science+Business Media LLC.

Christensen JE., Reynolds CE., Shukla SK. and Reed KD., 2004. Rapid molecular diagnosis of *Lactobacillus bacteremia* by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. Clinical medicine and research 2 (1): 37-45.

Ioos R. and Frey P., 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa, M. fructigena and M. fructicola*, and application to species identification by PCR. European Journal Plant Pathology 106: 373-378. https://doi.org/10.1023/A:1008798520882

Jarausch W., Jarausch B., Fritz M., Runne M., Etropolska A. and Pfeilstetter E., 2019. Epidemiology of European stone fruit yellows in Germany: the role of wild *Prunus spinosa*. European Journal of Plant Pathology 154: 463-476.

Jarausch B., Schwind N., Fuchs A., and Jarausch W., 2011. Characteristics of the spread of apple proliferation by its vector Cacopsylla picta. Phytopathology, 101 (12): 1471-1480.

King, EO., Ward MK. and Raney DE., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301–307.

Klement Z. and Goodman RN., 1967. The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. Annual Review of Phytopathology 5 (1): 17-44.

Knief C., 2014. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. Frontiers Plant Science. Doi: 10.3389/fpls.2014.00216

Kotan R. and Sahin F., 2002. First record of bacteerial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on apricot trees in Turkey. Plant Pathology 51: 798.

Lamichhane JR, Varvaro I., Parisi I., Audergon J-M, Morris CE., 2014. Disease and frosr damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. Advanced in Agronomy 126, 235-95.

Lamichhane J., Messéan A. and Morris C., 2015. Insights in epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. Journal of General Plant Pathology 89(1): 331-350.

Lecomte P., Pèros JP., Blancard D., Bastien N. and Dèlye C., 2000. PCR assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. Applied and Environmental Microbiology 66: 4475–80.

Lorenz KH., Schneider B., Ahrens U. and Seemüller F., 1995. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. Phytopathology 85(7): 771-776.

Ludvíková H., Fránová J. and Suchá J., 2011. Phytoplasmas in apricot, peach and sour orchards in east Bohemia, Czech Republic. Bulletin of Insectology 64 (Supplement): S67-S68.

Mehle N., Nikolić P., Rupar M., Boben J., Ravnikar M. and Dermastia M., 2013. Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology,* vol.938 (Ed. Dickinson M and Hodgess JR), pp. 139-145. Springer Science+Business Media LLC.

Morris, C., Sands, D., Vinatzer, B. *et al.,* 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. ISME Journal (2): 321–334. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.113

Navrátil M., Válová P., Fialová R., Petrová K., Poncarová-Vondráčková Z., Fránová J., Nebesářová J. and Karešová R., 2001. Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. Acta Horticulturae 550: 377-382.

Parisi L., Morgaint B., Blanco-Garcia J., Guilbaud C., Chandeysson C., Bourgeay JF., Moronvalle A., Brun L., Brachet ML and Morris CE., 2019. Bacteria from fylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot. Plant Pathology 68: 1249-1258.

Rajwar A. and Sahgal M., 2016. Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, *Pseudomonas*-specific and *rpoD* genes 3. Biotechnology 6 (1): 1-10. DOI:10.1007/s13205-016-0386-x

Riedle-Bauer M., Paleskić C., Schwanzer J, et al., 2019. Epidemiological and molecular study on of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' in Austria and Hungary. Annual Applied Biology: 1-15. https://doi.org/10.1111/aab.12541

Sambrook J. and Russell DW., 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. In: Cold Spring Harbor Protocols. Doi: 10.1101/pdb.prot4455.

Sarkar SF. and Guttman DS., 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Applied Environmental Microbiology 70 (4): 1999-2012.

Schneider B., Seemüller E., Smart CD. and Kirkpatrick BC., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or Phytoplasmas. In: Razin, S. and Tully, J.G. Eds., Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Vol. I. Academic Press, San Diego, p. 369-380. http://dx.doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50040-6

Steffek R., Follak S., Sauvion N., Labonne G. and MacLeod A, 2012: Distribution of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: A Review. EPPO Bulletin 42 (2): 191-192.

Vicente JG., Alves JP., Russell K., Roberts SJ., et al., 2004. Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. European Journal of Plant Pathology 110: 337-351.

Travadon R. and Baumgartner K., 2015. Molecular polymorphism and phenotypic diversity in the Eutypa dieback pathogen Eutypa lata. Phytopathology 105: 255-264.

Vigouroux A., 1989. Ingress and spread of *Pseudomonas* in stems of peach and apricot promoted by frost-related water-soaking of tissues. Plant Disease 88: 854-855.

Weaver DJ., 1978. Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. Phytopathology 68: 1460-1463.

Wenneker M., Janse JD., de Bruine A., Vink P., Pharm K., 2012. Bacterial canker of plum caused by *Pseudomonas syringae* pathovars, as a serious threat for plum production in the Netherlands. Journal of Plant Pathology 94: 511-513.

Yvon M., Thébaud G., Alary R. and Labonne G., 2009. Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent 'Candidatus Phytoplasma prunorum'. Molecular and Cellular Probes 23 (5): 227–234.

Použitá literatura je uložena u autorů metodiky.

8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ

Krejzar V., Pánková I. a Krejzarová, R., 2019: Výskyt přirozené infekce bakterie *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* na ořešáku královském. Rostlinolékař 2 (30), 30-34.

Pánková I., Krejzar V., Krejzarová, R., 2019: Porovnání patogenity subtropických a českých kmenů *Ralstonia solanacearum*. Rostlinolékař 3 (30), 13-19.

Krejzar V., Pánková I., Krejzarová, R., 2019: Bakteriální patogeny a předčasné odumírání meruňky a broskvoně. Rostlinolékař 4 (30), 13-17.
Krejzar V., Pánková I., Krejzarová, R., 2019: Inovace integrované produkce teplomilného ovoce se zaměřením na zdravotní stav produkčních výsadeb a rozmnožovacího materiálu peckovin. Kobylí 28. 11. 2019.

Seznam souvisejících publikovaných článků je k dispozici u autorů.

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Specifické primery pro identifikaci bakterií z komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR
Tabulka 2: Reakční směs pro amplifikaci specifických úseků bakterií jednotlivých skupin komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR
Tabulka 3: Cyklus pro amplifikaci specifických úseků bakterií jednotlivých skupin komplexu *Pseudomonas syringae* metodou real-time PCR
Tabulka 4: Primery pro pre-amplifikaci dle (Christensen et al., 2004), (Hodgetts et al., 2009) širšího spektra fytoplazem na dřevinách a následnou amplifikaci fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum'metodou real-time PCR
Tabulka 5: Reakční směs pro pre-amplifikaci úseků specifických pro širší spektrum fytoplazem na dřevinách (Christensen et al., 2004), (Hodgetts et al., 2009) a amplifikaci úseků specifických pro *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Hodgetts et al., 2009) metodou real-time PCR
Tabulka 6: Cyklus pro pre-amplifikaci úseků specifických pro širší spektrum fytoplazem na dřevinách dle Christensen et al., 2004 , Hodgetts et al., 2009 a amplifikaci úseků specifických pro *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Hodgetts et al., 2009) metodou real-time PCR
Tabulka 7: Primery pro amplifikaci širšího spektra cytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou
Tabulka 8: Reakční směs pro amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou
Tabulka 9: Cyklus pro amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách konvenční metodou PCR a pre-amplifikaci širšího spektra fytoplazem na dřevinách a identifikaci fytoplazmy ‚*Candidatus* Phytoplasma prunorum' nested PCR metodou

Tabulka 10: RFLP analýza produktů konvenční nebo nested PCR, identifikace fragmentů *Candidatus* Phytoplasma prunorum‘
Tabulka 11: Primery pro amplifikaci *Monilinia* spp. metodou real-time PCR – *Monilinia fructicola*, *M. fructigena, M. laxa, Monilia polystorma* a konvenční PCR
Tabulka 12: Reakční směs pro amplifikaci specifických úseků fytokaranténní houby *Monilinia fructicola* metodou real-time PCR a konvenční PCR
Tabulka 13: Cyklus pro amplifikaci specifických úseků fytopatogenních houby *Monilinia fructicola* metodou real-time PCR a konvenční PCR metodou
Tabulka 14: Specifické primery pro pre-amplifikaci a identifikaci *Eutypa lata* konvenční metodou PCR
Tabulka 15: Reakční směs pro amplifikaci úseků specifických pro houbu *Eutypa lata* konvenční PCR
Tabulka 16: Cyklus pro amplifikaci úseků specifických pro houbu *Eutypa lata* primery ITS1F/ITS4, EL1/EL4 a Lata1/Lata2-2 konvenční PCR

10. OBRAZOVÁ ČÁST

Titulní strana – ilustrační fotografie
Obrázek 1: Předčasné odumírání meruňky ve starší výsadbě
Obrázek 2: Mladá výsadba meruňky s příznaky syndromu předčasného odumírání
Obrázek 3: Detail příznaku syndromu předčasného odumírání v mladé výsadbě meruňky v podobě nekrózy korového pletiva na kosterní větvi
Obrázek 4: Zčernalý vrchol výhonu meruňky v období dormance
Obrázek 5, 6, 7, 8: Skvrny a nekrotické léze na listech meruňky a broskvoně způsobené bakteriemi rodu *Pseudomonas*
Obrázek 9, 10, 11, 12, 13: Nekrózy korového pletiva na kosterních větvích meruňky způsobené bakteriemi rodu *Pseudomonas*
Obrázek 14: Drsné kolonie bakterie *Pseudomonas syringae* na živném médiu
Obrázek 15: Nekrotické cévní svazky uvnitř výhonů meruňky při vysoké četnosti infekce
Obrázek 16: Nekrotické cévní svazky uvnitř výhonů meruňky při nízké četnosti infekce
Obrázek 17: Epifyt květů meruňky kolonizovaný spektrem mikroorganizmů po smyvu na živné médium
Obrázek 18: Čistá kultura bakterie *Pseudomonas syringae* na živném médiu po smyvu z květů meruňky

Obrázek 19: Výhony, listy a plody meruňky poškozené působením jarních mrazů
Obrázek 20: Výhony, listy a plody meruňky poškozené působením jarních mrazů
Obrázek 21: Detail mrazového poškození čepele listu meruňky
Obrázek 22: Epifytní mikroflóra listů meruňky po smyvu na živné médium
Obrázek 23: Fluidní (hladká) virulentní kultura determinované bakterie *Pseudomonas taetrolens* s extracelulárním polysacharidovým slizem na povrchu buněk, získaná z nekrotické léze na korovém pletivu meruňky (viz obr. 3) v období před začátkem kvetení
Obrázek 24: Fluidní (hladká) virulentní kultura determinované bakterie *Pseudomonas taetrolens* přecházející v drsnou slabě virulentní formu během kultivace na živném médiu
Obrázek 25: Nekrotický vrchol výhonu broskvoně doprovázený výronem slizu po infekci bakterií *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*
Obrázek 26: Příznaky Leucostoma canker na letorostu broskvoně
Obrázek 27: Metabolický profil bakterie *Pseudomonas syringae* determinované metodou Biolog GEN III
Obrázek 28: Plynový chromatograf - Agilent Technologies - pro determinaci fytopatogenních bakterií metodou FAME
Obrázek 29: Přístroj Rotor-Gene Q pro determinaci fytopatogenních bakterií metodou real-time PCR
Obrázek 30: Nekrotická léze na povrchu kosterní větve meruňky
Obrázek 31: Květy meruňky odebírané pro monitorování spektra epifytní mikroflóry
Obrázek 32: Listy meruňky odebírané pro monitorování spektra epifytní mikroflóry
Obrázek 33: Přechod mezi zdravou a infikovanou částí výhonu meruňky původcem korové nekrózy na podélném řezu
Obrázek 34-40: Postup determinace kmenu fytopatogenní bakterie metodou Biolog GEN III
Obrázek 41-49: Postup determinace kmenu fytopatogenní bakterie metodou FAME
Obrázek 50: Hypersenzitivní reakce izolátu fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* na listu tabáku
Obrázek 51: Patogenní reakce na detašovaném výhonu meruňky po aplikaci fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*
Obrázek 52: Patogenní reakce na listu meruňky po aplikaci fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*

Obrázek 53: Patogenní reakce na detašovaném výhonu broskvoně po aplikaci fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*
Obrázek 54: Patogenní reakce na listu broskvoně po aplikaci fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae*
Obrázek 55: Zasychající vrcholová část letorostu meruňky po inokulaci bakterií *Pseudomonas syringae*
Obrázek 56: Křížový roztěr smyvu epifytní mikroflóry do sterilní destilované vody na živném médiu
Obrázek 57: Detail křížového roztěru smyvu epifytní mikroflóry do sterilní destilované vody na živném médiu
Obrázek 58: Antibiotické zóny bakteriálních izolátů získaných z epifytu meruňky vytvořené na živném médiu kontaminovaném původci bakteriální korové nekrózy
Obrázek 59: Ledová nukleační aktivita bakteriálního izolátu při teplotě -3,2°C ve zkumavce (vpravo) v porovnání s kontrolní variantou sdH_2O (vlevo)
Obrázek 60: Produkční sad meruňky ve vegetační fázi na začátku kvetení (nová výsadba Těšetice)
Obrázek 61: Zadní strana – produkční sad meruňky v období kvetení (Kobylí)

Obr. 60: Produkční sad meruňky ve vegetační fázi na začátku kvetení

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i.

DETEKCE PŮVODCŮ KOROVÝCH NEKRÓZ A PŘEDČASNÉHO ODUMÍRÁNÍ MERUNĚK A BROSKVONÍ, PŘEDEVŠÍM BAKTERIEMI KOMPLEXU *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, V MNOŽITELSKÝCH MATERIÁLECH A V PRODUKČNÍCH SADECH

Certifikovaná metodika *(č. UKZUZ 183619/2020)*

Vydal: ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.,
Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6 - Ruzyně

Vydání první. Náklad: 50 výtisků

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2020

ISBN 978-80-7427-330-8

www.vurv.cz