

IDENTIFIKACE GENOTYPŮ FYTOPLAZMY '*CANDIDATUS* *PHYTOPLASMA MALI*' ZA POUŽITÍ GENU *IMP* A JEJICH GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ V ČESKÉ REPUBLICE

IDENTIFICATION OF '*CANDIDATUS* *PHYTOPLASMA MALI*' GENOTYPES USING *IMP* GENE AND THEIR GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION IN THE CZECH REPUBLIC

Martina Rejlová, Markéta Bohunická, Lucie Valentová, Josef Podlipný, Radek Čmejla

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
508 01 Holovousy

e-mail: martina.rejlova@vsuo.cz

ABSTRACT

The work summarizes the results of the study of genetic variability of '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' in the Czech Republic using *imp* gene that codes immunodominant membrane protein. Eighty-one *imp* gene sequences were obtained out of 98 phytoplasma positive samples. Based on the sequence alignment, seven distinct *imp* genotypes were defined belonging to two groups: A1 to A3, and B1 to B4. Interestingly, three *imp* genotypes (A2, A3, and B2) have been described for the first time. In 15 samples (18.5 %), mixed infections of various *imp* genotypes were noticed. Sequence similarity between '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' *imp* genotypes was 90.5 % to 99.8 %. Based on symptoms assessment, it is impossible to discriminate infected trees from uninfected with certainty, since 63.6 % phytoplasma negative samples showed symptoms, while 41.1 % phytoplasma positive samples were asymptomatic. A correlation between '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' *imp* genotype and symptoms was not observed.

Keywords: apple proliferation, immunodominant membrane protein, real-time PCR

Práce shrnuje výsledky studia genetické variability fytoplazmy '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' na území České republiky za použití genu *imp* kódujícího imunodominantní membránový protein. Z 98 vzorků pozitivních na přítomnost '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' bylo úspěšně získáno 81 sekvencí genu *imp*. Na základě srovnání sekvencí bylo definováno celkem 7 různých *imp* genotypů ve dvou skupinách označených A1 až A3 a B1 až B4, z nichž tři (A2, A3 a B2) byly popsány vůbec poprvé. Zachyceno bylo také značné množství směsných infekcí více genotypů *imp*, celkem v 15 vzorcích (18,5 %). Sekvenční podobnost jednotlivých genotypů genu *imp* se u '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' pohybovala v rozmezí od 90,5 % do 99,8 %. Na základě pozorovatelných symptomů nelze s jistotou stanovit, zda jsou jabloně fytoplazmou infikovány, neboť 63,6 % negativních vzorků na přítomnost fytoplazmy bylo symptomatických a 41,1 % fytoplasma-pozitivních vzorků nevykazovalo symptomy. Korelace mezi *imp* genotypem '*Candidatus* *Phytoplasma mali*' a typem symptomů nebyla též prokázána.

Klíčová slova: proliferace jabloně, imunodominantní membránový protein, real-time PCR

Fytoplazmy jsou prokaryotické organismy bez buněčné stěny parazitující v sítkovicích lýka. Řadí se do domény Bakterie, kmene Tenericutes, třídy Mollicutes, řádu *Acholeplasmatales*, čeledi *Acholeplasmataceae*, rodu *Candidatus Phytoplasma*. Napadají různé druhy rostlin, do nichž se dostávají nejčastěji prostřednictvím hmyzích přenašečů, živících se rostlinnými šťávami (Mittelberger *et al.* 2017). Hostitelské rostlině odebírají metabolity a ucpávají vodivá pletiva, což vede k projevům onemocnění prostřednictvím řady specifických i nespecifických symptomů, typických pro konkrétní druh fytoplazmy a hostitele.

Fytoplazma proliferace jabloně – '*Candidatus Phytoplasma mali*' se řadí do 16SrX skupiny na základě RFLP sekvence 16S rRNA genu (Zhao and Davis 2016), společně s dalšími patogeny ovocných dřevin '*Candidatus Phytoplasma pyri*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. Fytoplazmy 16SrX skupiny způsobují vážná onemocnění ovocných dřevin. '*Ca. P. mali*' způsobuje proliferaci jabloně (AP), '*Ca. P. pyri*' chřadnutí hrušně (PD) a '*Ca. P. prunorum*' evropskou žloutenku peckovin (ESFY) (Seemüller and Schneider 2004). '*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*' jsou v Evropské unii dle EPPO A2 doporučené k regulaci (OEPP/EPPO 2018).

Fytoplazma proliferace jabloně byla poprvé zaznamenána v Itálii (Seemüller and Schneider 2004). Řadí se do 16SrX-A podskupiny (Ciešlińska *et al.* 2015) a její přítomnost v hostitelské rostlině se projevuje nejčastěji metlovitostí, zvětšenými palisty, menšími a lehčími plody s nižším obsahem cukrů a kyselin. Patogen tak způsobuje značné ekonomické škody ve všech státech Evropy pěstujících jabloně (Seemüller *et al.* 2011). V rámci České republiky již byla v předešlých letech studována diverzita kmenů '*Ca. P. mali*' prostřednictvím multilokusové genové analýzy s využitím ribozomálních 16S – 23S genů, genů ribozomálních proteinů, nitroreductase like genu a rhodonase like genu (Fránová *et al.* 2013). Tyto geny jsou však málo intradruhově polymorfni. Cílem naší práce byla identifikace jednotlivých genotypů fytoplazmy '*Ca. P. mali*' pomocí genu *imp*, který je vysoce variabilní a k identifikaci jednotlivých genotypů ze všech dostupných markerů nejvhodnější

(Dermastia *et al.* 2018). Předpokládá se, že tento protein hraje významnou roli v procesu komunikace patogenu s hostitelem, jelikož tvoří většinu mezi přítomnými povrchovými proteiny buněčné membrány '*Ca. P. mali*' (Konnerth *et al.* 2016).

Dalšími cíli práce byla vyhodnocení geografické distribuce jednotlivých genotypů v České republice a ověření případných korelací genotypu přítomného patogenu s pozorovanými symptomy onemocnění.

MATERIÁL A METODY

Celkem bylo testováno 121 vzorků jabloní odebíraných po téměř celé České republice. Odběry vzorků byly prováděny v letech 2015 až 2017. Vzorky byly odebírány ze stromů z produkčních výsad, zahrádek a kolem cest, aby bylo zachyceno co nejvyšší množství pozitivních vzorků. Vybírány byly jak stromy asymptomatické, tak stromy vykazující typické příznaky proliferace jabloně, jako jsou zvětšené palisty a metlovitost na obrostu kmene či koruně stromu. Odebírány byly dvouleté výhony o délce přibližně 15–20 cm, vždy alespoň 4 z jednoho stromu, z každé světové strany jedna. Z lýka výhonů byla pomocí kitu Exgene Plant SV mini firmy GeneAll izolována celková DNA. Lýko bylo z výhonů seškrábáno skalpelem a poté v třetí misce s tekutým dusíkem rozmělněno na jemný prášek. Získaná DNA byla dále testována na přítomnost fytoplazem skupiny 16SrX pomocí real-time PCR akreditovanou metodou zavedenou v laboratoři, identita fytoplazmy proliferace jabloně byla potvrzena pomocí RFLP. Pozitivní vzorky byly použity k amplifikaci genu *imp* o předpokládané délce cca 640 bp s využitím primerů Imp-Pma,py-F01 (CTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGG) a Imp-Pma,py-R01 (CAAGACCTTTAAGGCCACATCC). Teplotní a časový profil amplifikace genu *imp*: 1 cyklus 95 °C 5 min; 40 cyklů 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s; 1 cyklus 72 °C 5 min a finální chlazení 8 °C. Po amplifikaci byla provedena gelová elektroforéza použitím 3% agaróзовého gelu. Získané amplikony byly přečištěny pomocí kitu Expin™ Combo GP firmy GeneAll. Přečištěná DNA byla použita k sekvenační PCR reakci s využitím kitu BigDye Terminator RR v3.1

podle návodu výrobce (ThermoFisher Scientific). Poté byla provedena samotná sekvenace na osmikapilárovém genetickém analyzátoru – AB3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). Pro analýzu variability genu *imp* byla použita sekvence od nukleotidu +73 (Ile 25) do nukleotidu 81 z 3' nepřekládané oblasti o celkové délce 507–516 bp dle genotypu. Sekvence byly dále analyzovány v programu Chromas 2.6.6. a zpracovány v programu MEGA X (Kumar *et al.* 2018), ve kterém byla vypočítána variabilita genu *imp*, vytvořeno porovnání sekvencí a následně i fylogenetický strom. Nalezené sekvence byly také ověřeny srovnáním s databází GenBank pomocí nástroje BLAST.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci České republiky jde o první pokus o identifikaci genotypů fytoplazmy proliferace jableň *'Ca. P. mali'* s využitím genu pro imunodominantní membránový protein (*imp*). V základním souboru 121 vzorků byla potvrzena přítomnost fytoplazmy u 98 (81 %) vzorků a z těchto vzorků bylo získáno 81 (82,7 %) sekvencí genu *imp*. To je patrně dáno tím, že gen *imp* je velmi A/T bohatý a špatně se amplifikuje, takže se u slabě pozitivních vzorků nepodařilo získat sekvence v dostatečné kvalitě. Sekvence byly vzájemně porovnány a na základě vytvořeného fylogenetického stromu byly nalezené genotypy genu *imp* rozděleny do dvou skupin a pojmenovány AP-A a AP-B. Skupiny byly dále rozděleny do podskupin A1 až A3 a B1 až B4 (viz Obrázek 1). Získané sekvence byly ověřeny v databázi GenBank a z identifikovaných genotypů byly genotypy AP-A2, AP-A3 a AP-B2 popsány vůbec poprvé. Po srovnání s fylogenetickým stromem pro *'Ca. P. pyri'* (Bohunická *et al.* 2018), ve kterém byla zaznamenána vysoká mezidruhová variabilita (17 genotypů, z toho 3 genotypy *'Ca. P. pyri'* jsou dokonce evolučně bližší k *'Ca. P. mali'*), a fylogenetickým stromem pro *'Ca. P. prunorum'* (Valasevich and Schneider 2016), které patří do stejné skupiny fytoplazem 16SrX v rámci rodu *Candidatus Phytoplasma*, byl fylogenetický strom pro *'Ca. P. mali'* vyhodnocen jako silně homogenní s nízkou vnitrodruhovou variabilitou (viz Obrázek 1).

V rámci studie byla zjištěna sekvenční podobnost mezi jednotlivými *imp* genotypy od 90,5 % do 99,8 % (viz Tabulka 1), což je variabilita nižší než ta, která byla zjištěna při výzkumu probíhajícím ve Slovinsku, kde byla nalezena podobnost genotypů *imp* od 85,7 % do 99,8 % (Dermastia *et al.* 2018). V rámci slovinské studie byly analyzovány sekvence genu *imp* o délce přibližně 510 bp, což je srovnatelné s naší analýzou. Vyšší variabilita ve slovinské studii je tedy dána pravděpodobně tím, že se podařilo v rámci skupiny AP-A zachytit variabilnější genotyp označený jako I33 (GenBank sekvence č. MG972428.1).

Shrnutí identifikovaných genotypů a přítomnost symptomů je uvedeno v Tabulce 2. Téměř ¾ identifikovaných genotypů patří do skupiny AP-B, hlavně podskupin AP-B1 a AP-B3. Skupina AP-A tvoří pouze 8,6 % mezi identifikovanými genotypy fytoplazmy. V rámci analýzy sekvencí byla u 18,5 % vzorků identifikována smíšená infekce, a to jak genotypy AP-A a APB, tak pouze různými genotypy AP-B. Zajímavé je, že nebyl zachycen žádný vzorek se smíšenou infekcí pouze genotypů ze skupiny AP-A. U tří vzorků byla dokonce identifikována přítomnost tří různých genotypů fytoplazmy proliferace jableň. Tři nově popsané genotypy (AP-A2, APA3 a AP-B2) byly také zachyceny ve smíšených infekcích. Z těchto tří genotypů se v nich nejčastěji vyskytoval genotyp AP-A3 a jednu z kombinací smíšených infekcí, tvořenou dvěma genotypy, tvořil dokonce společně s druhým z nově identifikovaných genotypů AP-B2. Smíšené infekce byly také zaznamenány ve Slovinsku, kde byl na stejné lokalitě identifikován strom a hmyzí přenašeč, kteří obsahovali identickou kombinaci *imp* genotypů *'Ca. P. mali'* (Dermastia *et al.* 2018). V České republice byla smíšená infekce zachycena v rámci studia genetické diversity *'Ca. P. mali'* prostřednictvím multilokusové genové analýzy (Fránová *et al.* 2013).

Co se týká symptomů, tak je zajímavé, že stromy infikované *'Ca. P. mali'* s *imp* genotypem ze skupiny AP-A vykazovaly více symptomů (> 70 %) než ostatní skupiny – AP-B i smíšené infekce (< 60 %) a zdá se, že fytoplazmy s genotypem AP-A by mohly být agresivnější než ostatní skupiny. Pro potvrzení této hypotézy

bude však nutné provést analýzy na větším počtu vzorků. Tabulka 3 ukazuje přítomnost symptomů u vzorků, které byly pozitivně nebo negativně testovány na přítomnost fytoplazmy 'Ca. P. mali'. Z tabulky je patrné, že 63,6 % negativních vzorků bylo symptomatických a 41,1 % fytoplazma-pozitivních vzorků naopak symptomy nevykazovalo. Naše výsledky tak potvrzují, že nelze pouze na základě symptomů jednoznačně určit, zda je strom infikován fytoplazmou a vždy je nutné k průkazu patogenu použít další odpovídající metody.

Jelikož byly vzorky odebírány po téměř celé České republice (kromě hlavního města Prahy, Jihomoravského a Zlínského kraje), lze v rámci České republiky určit geografické rozšíření zaznamenaných genotypů (viz Tabulka 4). Nejvíce vzorků pozitivních na přítomnost fytoplazmy bylo zaznamenáno v Královhradeckém kraji, a to celkem 16 (16,3 % všech pozitivních vzorků). Genotyp AP-B1, který je v České republice ze všech zjištěných genotypů nejčastěji se vyskytující, dominoval v Královhradeckém kraji, kde byl zachycen osmkrát (27,6 %). Dosud nepopsané genotypy

AP-A2, AP-A3 a AP-B2 byly zaznamenány ve Středočeském, Jihočeském, Královhradeckém a Libereckém kraji. V každém z vyjmenovaných krajů byl zaznamenán vždy jeden ze tří genotypů, pouze v Královhradeckém kraji byl zachycen genotyp AP-A2 společně s genotypem AP-B2. Směsných infekcí bylo zachyceno nejvíc ve Středočeském kraji. Směsné infekce v tomto kraji tvoří 45,6 % všech vzorků pozitivních na přítomnost fytoplazmy. Z krajů, ve kterých probíhaly odběry vzorků, nebyl získán žádný genotyp pouze v Karlovarském kraji, kde byly odebrány dva vzorky a jeden z nich byl pozitivní na přítomnost fytoplazmy.

Ve srovnání s výsledky dosaženými ve studii genetické diversity 'Ca. P. mali' prostřednictvím multilokusové genové analýzy (Fránová *et al.* 2013) bylo s využitím genu pro *imp* identifikováno celkem 7 genotypů, tedy o 4 genotypy více, čímž se potvrdil předpoklad autorů výše zmíněné studie o lepší vhodnosti genu *imp* pro fylogenetické analýzy vzhledem k jeho vysoké variabilitě.

PODĚKOVÁNÍ

Práce je součástí širšího výzkumu fytoplazem ovocných dřevin podpořeného MŠMT v rámci programu NPU I č. LO1608.

LITERATURA

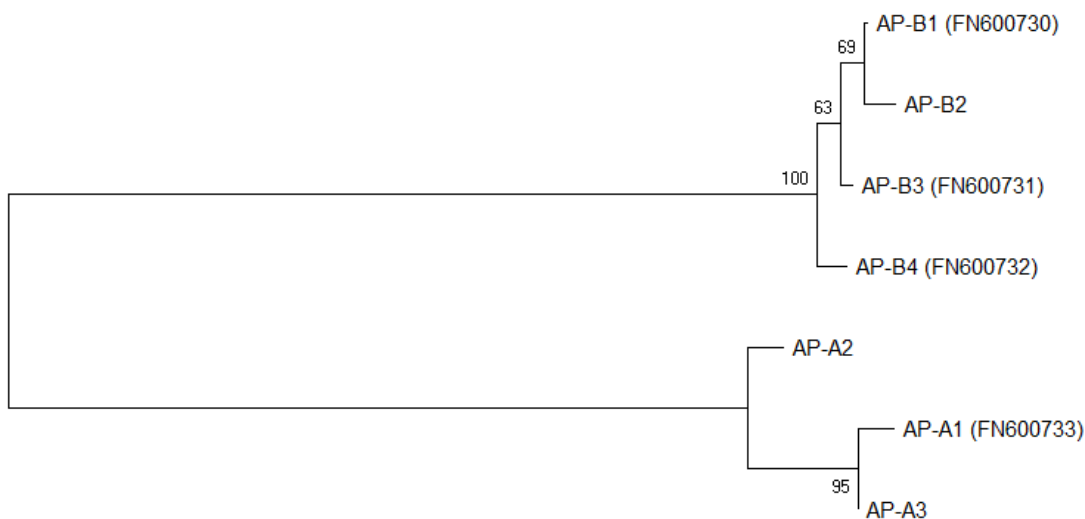
- BOHUNICKÁ, M., L. VALENTOVÁ, J. SUCHÁ, T. NEČAS, A. EICHMEIER, T. KISS and R. ČMEJLA. Identification of 17 'Candidatus Phytoplasma pyri' genotypes based on the diversity of the *imp* gene sequence. *Plant Pathology*. 2018, **67**(4): 971–977. DOI: 10.1111/ppa.12805.
- CIEŠLIŇSKA, M., E. HENNIG, D. KRUCZYŇSKA and A. BERTACCINI. Genetic diversity of 'Candidatus Phytoplasma mali' strains in Poland. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015, **54**(3): 477–487. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-15785.
- DERMASTIA, M., D. DOLANC, P. MLINAR and N. MEHLE. Molecular diversity of Candidatus Phytoplasma mali' and 'Ca. P. prunorum' in orchards in Slovenia. *European Journal of Plant Pathology*. 2018, **152**(3): 791–800. DOI: 10.1007/s10658-018-1528-2.
- FRÁNOVÁ, J., H. LUDVÍKOVÁ, F. PAPRŠTEIN and A. BERTACCINI. Genetic diversity of Czech 'Candidatus Phytoplasma mali' strains based on multilocus gene analyses. *European Journal of Plant Pathology*. 2013, **136**(4): 675–688. DOI: 10.1007/s10658-018-1528-2.
- KONNERTH, A., G. KRCZAL and K. BOONROD. Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas. *Microbiology*. 2016, **162**(8): 1267–1273. DOI: 10.1099/mic.0.000331.

- KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ and K. TAMURA. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018, **35**(6): 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- MITTELBERGER, C., L. OBKIRCHER, S. OETTL, T. OPPEDISANO, F. PEDRAZZOLI, B. PANASSITI, C. KERSCHBAMER, G. ANFORA and K. JANIK. The insect vector *Cacopsylla picta* vertically transmits the bacterium '*Candidatus Phytoplasma mali*' to its progeny. *Plant Pathology*. 2017, **66**(6): 1015–1021. DOI: 10.1111/ppa.12653.
- OEPP/EPPO. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. [epo.int \[online\]](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list). ©2019 [cit. 2019-07-12]. Dostupné z: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list.
- SEEMÜLLER, E., L. CARRARO, W. JARAUSCH and B. SCHNEIDER. Apple proliferation phytoplasma. In: HADIDI, A., M. BARBA, T. CANDRESSE and W. JELKMANN, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. APS Press/American Phytopathological Society, 2011, s. 67–75. ISBN: 978-0-89054-501-0.
- SEEMÜLLER, E. and B. SCHNEIDER. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, **54**(4): 1217–1226. DOI: 10.1099/ijms.0.02823-0.
- VALASEVICH, N. and B. SCHNEIDER. Detection, identification and molecular diversity of '*Candidatus Phytoplasma Prunorum*' in Belarus. *Journal of Plant Pathology*. 2016, **98**(3): 625–629. DOI: 10.4454/JPP.V98I3.031.
- ZHAO, Y. and R.E. DAVIS. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016, **66**(5): 2121–2123. DOI: 10.1099/ijsem.0.000999.

TABULKY

Obrázek 1. Fylogenetický strom identifikovaných genotypů 'Ca. P. mali' dle genu pro imp. Kódy v závorce odkazují na databázi GenBank. Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí metody neighbor-joining. Délky větví odpovídají evolučním vzdálenostem vypočítaných metodou počtu rozdílů. Procento fylogenetických stromů, ve kterých byly příbuzné taxony sdruženy v rámci bootstrap testu (1000 opakování) je zobrazeno vedle vývojové větve.

Picture 1. The phylogenetic tree of identified 'Ca. P. mali' genotypes according to the imp gene. The codes in brackets refer to the GenBank database. The phylogenetic tree was created using the neighbor-joining method. The lengths of the branches correspond to the evolutionary distances computed using the number of differences method. The percentage of phylogenetic trees in which related taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches.



Tabulka 1. Sekvenční podobnost nalezených genotypů *imp***Table 1.** Sequence similarity of obtained *imp* genotypes

	AP-B1	AP-B2	AP-B3	AP-B4	AP-A1	AP-A2
AP-B1						
AP-B2	99,8 %					
AP-B3	99,8 %	99,6 %				
AP-B4	99,6 %	99,4 %	99,6 %			
AP-A1	90,5 %	90,5 %	90,7 %	90,7 %		
AP-A2	91,1 %	91,1 %	91,3 %	91,3 %	99 %	
AP-A3	90,7 %	90,7 %	90,9 %	90,9 %	99,8 %	99,2 %

Tabulka 2. Četnosti jednotlivých *imp* genotypů a přítomnost symptomů. (NA = Symptomy nejsou k dispozici)**Table 2.** Summary of identified *imp* genotypes and symptoms. (NA = Symptoms not available)

GenBank č.	Genotyp	n		Bez symptomů ¹⁾	Symptomy ²⁾	NA
FN600733	AP-A1	4		2	2	0
	AP-A2	1		0	1	0
	AP-A3	2		0	2	0
	AP-A	7	8,6 %	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)	0
FN600730	AP-B1	29		9	17	3
	AP-B2	2		1	1	0
FN600731	AP-B3	20		7	12	1
FN600732	AP-B4	8		5	2	1
	AP-B	59	72,8 %	22 (40,7 %)	32 (59,3 %)	5
	AP-A1+AP-B1	1		1	0	0
	AP-A1+AP-B4	1		1	0	0
	AP-A3+AP-B1	2		1	1	0
	AP-A3+AP-B2	1		0	1	0
	AP-B1+AP-A1-A2	1		0	1	0
	AP-A+AP-B	6	7,4 %	3 (50 %)	3 (50 %)	0
	AP-B1+AP-B3	2		1	1	0
	AP-B1+AP-B4	4		1	3	0
	AP-B1+AP-B3-B4	2		1	1	0
	AP-B3+AP-B4	1		1	0	0
	AP-B směs ³⁾	9	11,1 %	4 (44,4 %)	5 (55,6 %)	0
	Celkem směsných ⁴⁾	15	18,5 %	7 (46,7 %)	8 (53,3 %)	0
	Celkem ⁵⁾	81		31 (40,8 %)	45 (59,2 %)	5

1) No symptoms, 2) Symptoms, 3) AP-B mix, 4) Total mixed infections, 5) Total

Tabulka 3. Přítomnost symptomů u pozitivně nebo negativně testovaných vzorků na přítomnost fytoplazmy 'Ca. P. mali'. (NA = Symptomy nejsou k dispozici)

Table 3. Presence of symptoms in positively or negatively tested samples for the presence of phytoplasma 'Ca. P. should'. (NA = Symptoms not available)

Fytoplazma ¹⁾	Bez symptomů ²⁾	Symptomy ³⁾	NA
Negativ.	4 (36,4 %)	7 (63,6 %)	12
Pozitiv.	37 (41,1 %)	53 (58,9 %)	8
Celkem ⁴⁾	41	60	20

1) Phytoplasma, 2) No symptoms, 3) Symptoms, 4) Total

Tabulka 4. Geografické rozšíření identifikovaných genotypů 'Ca. P. mali' v České republice. (STČ = Středočeský kraj, JHČ = Jihočeský kraj, PLK = Plzeňský kraj, VYS = Kraj Vysočina, MSK = Moravskoslezský kraj, ULK = Ústecký kraj, OLK = Olomoucký kraj, HKK = Královehradecký kraj, PAK = Pardubický kraj, KVK = Karlovarský kraj, LBK = Liberecký kraj)

Table 4. The geographical distribution of the identified 'Ca. P. mali' genotypes in the Czech Republic. (STČ = Central Bohemian Region, JHČ = South Bohemian Region, PLK = Pilsen Region, VYS = Highlands region, MSK = Moravian-Silesian Region, ULK = Usti Region, OLK = Olomouc Region, HKK = Hradec Kralove Region, PAK = Pardubice Region, KVK = Karlovy Vary Region, LBK = Liberec Region)

	STČ	JHČ	PLK	VYS	MSK	ULK	OLK	HKK	PAK	KVK	LBK	Celkem ¹⁾
AP-A1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	4
AP-A2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
AP-A3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
AP-B1	3	3	6	2	2	2	0	8	1	0	2	29
AP-B2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
AP-B3	0	0	3	0	5	3	6	1	0	0	2	20
AP-B4	2	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	8
Směsné infekce ⁴⁾	5	1	0	0	2	0	1	2	1	0	3	15
Odebráno ²⁾	11	8	25	4	18	12	12	17	4	2	8	121
Fytoplazma + ³⁾	11	8	13	4	15	10	9	16	3	1	8	98

1) Total, 2) Sampled, 3) Phytoplasma +, 4) Mixed infection