

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Studie fytoplazem
Candidatus Phytoplasma prunorum
a *Candidatus Phytoplasma mali*
v populacích vektorů

Diplomová práce

Bc. Martina Horníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2012

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením Prof. RNDr. Milana Navrátila, CSc. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

Děkuji prof. RNDr. Milanu Navrátilovi, CSc. za jeho trpělivost, ochotu i čas, který mi při psaní diplomové práce věnoval, za jeho odborné rady, praktické připomínky a vysvětlení celé problematiky. Dále chci poděkovat RNDr. Pavlu Lautererovi, Ing. Václavu Čermákovi a Mgr. Martinovi Starému za sběr jedinců *Cacopsylla* spp. a jejich roztřídění dle druhu a pohlaví. Děkuji i Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. a Janě Veselské za jejich pomoc a odborné rady při práci v laboratoři.

Souhrn

Fytoplazmy jsou prokaryotní organismy, které byly poprvé pozorovány v roce 1967. Kolonizují sítkovce rostlin, čímž brání transportu látek, a navíc hostitelské rostlině odnímají růstové a zásobní látky, což způsobuje výrazné růstové změny, které vedou ke snížení kvality a množství výnosů. Jsou proto ekonomicky významnými rostlinnými patogeny. Do hostitelských rostlin se dostávají pomocí bodavě savého hmyzu. V případě *Candidatus Phytoplasma prunorum* a *Ca. P. mali* se jedná o mery rodu *Cacopsylla*.

Cílem bylo detekovat fytoplazmu evropské žloutenky peckovin v jedincích *Cacopsylla pruni* a fytoplazmu proliferace jabloně v jedincích *C. picta* a *C. melanoneura*. Ve všech případech se jednalo o mery odchycené na zimovištích. Dále byla stanovena koncentrace *Ca. P. prunorum* ve vektoru pomocí kvantitativní PCR. Výsledky této práce rozšířily poznatky o molekulární epidemiologii fytoplazem a bionomii jejich vektorů.

Celkem bylo odchyceno a analyzováno 803 jedinců *Cacopsylla* spp. (346 kusů *C. pruni*, 141 kusů *C. picta*, 316 kusů *C. melanoneura*). Fytoplazma evropské žloutenky peckovin byla detekována v 21 % samců a 23 % samic *C. pruni*. Fytoplazmu proliferace jabloně obsahovalo 10 % samců a 19 % samic *C. picta* a 9 % samců a 19 % samic *C. melanoneura*. Rozpětí koncentrace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v samcích *C. pruni* nabývalo hodnot 1 až 6 538 156 kopií na jednoho jedince. V samicích byl zjištěn obsah ESFY v rozmezí 1 až 4 092 739 kopií.

Summary

Phytoplasmas are procaryotic organisms that were first observed in 1967. They colonise sieve tubes, preventing the transport of matter, and also take the host growth and storage substances, causing significant growth changes that lead to reduced quality and quantity of yields. They are therefore economically important plant pathogens. To the host cells they come by the help of sap-feeding insect. In the case of *Candidatus* Phytoplasma prunorum and *Ca. P. mali* the insect is of the *Cacopsylla* genus.

The aim of the work was to detect the european stone fruit phytoplasma in *Cacopsylla pruni* individuals and the apple proliferation phytoplasma in *C. picta* and *C. melanoneura* individuals. All individuals were collected in overwintering sites. Furthermore, the concentration of *Candidatus* Phytoplasma prunorum was established by quantitative PCR in *C. pruni*. This work extended knowledge of the molecular epidemiology of phytoplasmas and vector bionomics.

Total the 803 *Cacopsylla* spp. individuals (346 pieces of *C. pruni*, 141 pieces of *C. picta*, 316 pieces of *C. melanoneura*) were collected and analysed. European stone fruit phytoplasma was detected in 21 % of males and 23 % of females *C. pruni*. Apple proliferation phytoplasma was contained in 10 % of males and 19 % of females *C. picta* and 9 % of males and in 19 % of females *C. melanoneura*. The ESFY concentration in males was measured in the range of 1 to 6 538 156 copies per individual. In the females the concentration was found in the range of 1 to 4 092 739 copies.

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíle práce.....	8
3 Literární přehled	9
3.1 Úvod do problematiky fytoplazem.....	9
3.2 Taxonomické členění fytoplazem	10
3.3 <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum.....	11
3.3.1 Příznaky evropské žloutenky peckovin	11
3.3.2 Distribuce v rostlině.....	12
3.3.3 Způsoby přenosu.....	12
3.4 <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali.....	13
3.4.1 Příznaky proliferace jabloně	13
3.4.2 Distribuce v rostlině.....	13
3.4.3 Způsoby přenosu.....	14
3.5 Vztah fytoplazma – vektor	14
3.6 Biologie čeledi <i>Psyllidae</i>	15
3.7 Vektoři <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum.....	16
3.8 Vektoři <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali	16
3.9 Využití real-time PCR ve studiu fytoplazem	17
4 Materiál a metody.....	20
4.1 Materiál	20
4.2 Izolace DNA	20
4.3 Detekce fytoplazem ve vektorech pomocí nested PCR.....	21
4.4 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu.....	22
4.5 Příprava standardu pro kvantitativní PCR.....	23
4.5.1 PCR amplifikace ribozomálního segmentu ECA1/ECA2	23
4.5.2 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu	24
4.5.3 Purifikace PCR produktu	24
4.5.4 Ligace PCR produktu	25
4.5.5 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	25
4.5.6 Izolace plazmidu	27
4.6 Absolutní stanovení koncentrace ESFY ve vzorcích	28
4.7 Přístrojové vybavení laboratoře	29
5 Výsledky.....	30
5.1 Výskyt vektorů a detekce fytoplazem pomocí nested PCR	30
5.1.1 Výskyt vektoru <i>Cacopsylla pruni</i>	31
5.1.2 Detekce <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum v jedincích <i>Cacopsylla pruni</i>	32
5.1.3 Výskyt vektoru <i>Cacopsylla picta</i>	34
5.1.4 Detekce <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali v jedincích <i>Cacopsylla picta</i>	35
5.1.5 Výskyt vektoru <i>Cacopsylla melanoneura</i>	37
5.1.6 Detekce <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali v jedincích <i>Cacopsylla melanoneura</i>	38
5.2 Příprava standardu a kalibrační křivky pro kvantitativní PCR.....	40
5.3 Kvantitativní stanovení fytoplazmy <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum v <i>C. pruni</i>	42
6 Diskuze.....	44
7 Závěr.....	49
8 Seznam použitých zkratk.....	50
9 Literatura	51
10 Příloha	57

1 Úvod

Předložená diplomová práce se zabývá studiem fytoplazem *Candidatus Phytoplasma pruni* a *Candidatus Phytoplasma mali* v populacích vektorů na zimovištích.

Fytoplazmy jsou prokaryotické organismy, které osidlují sítkovce hostitelských rostlin. Napadené rostlině odnímají zásobní a růstové látky a brání transportu látek, čímž způsobují výrazné růstové změny. V důsledku těchto změn dochází ke snížení kvality a množství výnosů, což má za následek značné ekonomické ztráty. *Candidatus Phytoplasma pruni* napadá rod slivoní, hostitelem *Candidatus Phytoplasma mali* je především jablň domáci. V obou případech se jedná o hospodářsky významné patogeny.

Vektorem fytoplazmy evropské žloutenky peckovin je *Cacopsylla pruni*, vektory fytoplazmy proliferace jabloně jsou *Cacopsylla picta* a *C. melanoneura*. Pro detekci fytoplazem v těchto vektorech byla použita vysoce citlivá metoda nested PCR. U pozitivních jedinců *C. pruni* byla též provedena kvantifikace ESFY pomocí qPCR.

Cílem práce bylo rozšířit poznatky o molekulární epidemiologii fytoplazem a bionomii jejich vektorů. Výsledky práce pomohou navrhnout opatření, které by omezilo nebo zamezilo šíření fytoplazem v intenzivních výsadbách.

2 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo:

1. Vypracovat literární rešerši na téma molekulární epidemiologie *Candidatus Phytoplasma pruni* a *Candidatus Phytoplasma mali*.
2. Izolovat DNA z jedinců vektorů *Cacopsylla pruni*, *C. picta* a *C. melanoneura* odchycených na zimovištích.
3. Detekovat fytoplazmy *Candidatus Phytoplasma pruni* a *Candidatus Phytoplasma mali* pomocí nested PCR.
4. Stanovit koncentraci fytoplazmy ve vektoru *Cacopsylla pruni* pomocí kvantitativní PCR.

3 Literární přehled

3.1 Úvod do problematiky fytoplazem

Fytoplazmy jsou bakterie náležící do oddělení *Tenericutes*, třídy *Mollicutes* (Berges *et al.*, 2000). Poprvé byly pozorovány v šedesátých letech dvacátého století pomocí elektronového mikroskopu (Doi *et al.*, 1967). Tyto kulaté až vláknité buňky jsou velké 200 – 800 nm a nemají buněčnou stěnu (IRPCM, 2004). Jejich genom o velikosti 600 – 2 200 kb (Marccone *et al.*, 1999) je charakteristický nízkým obsahem cytosinových a guaninových bazí (Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998). Jejich původ je pravděpodobně odvozen od grampozitivních bakterií skupiny laktobacilů (Bai *et al.*, 2004). Fytoplazmy přežívají a množí se pouze v hypertonickém prostředí, na hypotonické prostředí jsou citlivé. Mohou se rozmnožovat pučením, přehrádečným dělením a fragmentací vláken (Seemüller *et al.*, 2004).

V roce 1967 byl poprvé zjištěn výskyt fytoplazem v sítkovicích aster (Doi *et al.*, 1967). Dnes je již známo, že fytoplazmy způsobují onemocnění řady rostlin, včetně těch hospodářsky důležitých, u kterých snižují kvalitu a množství výnosů. Z tohoto důvodu fytoplazmy patří mezi ekonomicky významné patogeny. V České republice se vyskytují karanténní fytoplazmy *Candidatus Phytoplasma mali*, *Ca. Phytoplasma prunorum*, *Ca. Phytoplasma pyri*, Stolbur *Phytoplasma*. V Evropské unii se dále vyskytují fytoplazmy jako Grapevine flavescence dorée *phytoplasma*, Peach rosette *phytoplasma*, Western X disease *phytoplasma* a další, které jsou rovněž řazeny mezi karanténní.

Fytoplazmy kolonizují sítkovici rostlin a mohou se vyskytovat i v průvodních parenchymatických buňkách hostitele (IRPCM, 2004). Do hostitelského organismu se dostávají pomocí svého vektora, zejména zástupců nadčeledi *Psylloidea*. Tento hmyz se živí rostlinnými šťávami, se kterými může nasát i fytoplazmu, jenž se v jeho organismu pomnoží. Při nabodnutí další rostliny je tak fytoplazma přenesena na nového hostitele. Jedná se tedy o perzistentní způsob přenosu. Hmyzí vektor většinou přítomností fytoplazmy ovlivněn není, ale v některých případech může fytoplazma způsobit jeho předčasnou smrt (McCoy *et al.*, 1989).

Příznaky napadení fytoplazmou jsou dány jejich výskytem v sítkovicích rostlin. Narušují funkce tohoto rostlinného pletiva a v důsledku toho dochází k růstovým změnám.

Tyto změny jsou dány odnímáním zásobních a růstových látek fytoplazmou, protože se jedná o nutričně náročné organismy (Seemüller *et al.*, 2004). Kromě odnímání pro rostlinu důležitých látek též blokuje transport látek v rostlině, což se opět odráží na morfologii rostliny. Mezi typické příznaky infekce fytoplazmou patří například redukce velikosti listů, žloutenka, chlorotická svinutka a předčasné opadávání listů, sterilita květů, předčasné opadávání nebo zasychání plodů, postupné odumírání výhonů až celého stromu (IRPCM, 2004). V některých případech však může být infekce bezpříznaková, tzv. latentní (McCoy *et al.*, 1989).

3.2 Taxonomické členění fytoplazem

Podle IRPCM (2004) jsou fytoplazmy, na základě sekvenční analýzy 16SrDNA, rozděleny do patnácti skupin. Jsou to skupiny Aster yellows group (16SrI), Peanut witches'-broom group (16SrII), X-disease group (16SrIII), Coconut lethal yellowing group (16SrIV), Elm yellows group (16SrV), Clover proliferation group (16SrVI), Ash yellows group (16SrVII), Loofah witches'-broom group (16SrVIII), Pigeon pea witches'-broom group (16SrIX), Apple proliferation group (16SrX), Rice yellow dwarf group (16SrXI), Stolbur group (16SrXII), Mexican periwinkle virescence group (16SrXIII), Bermuda grass white leaf group (16SrXIV) a '*Ca. Phytoplasma brasiliense*' group (16SrXV) (IRPCM, 2004). Skupina 16SrX je dle IRPCM reprezentována šesti kandidátními druhy, jež jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Kandidátní druhy Apple proliferation group (16SrX).

Kandidátní druh	Výskyt v Evropě	Výskyt v ČR	GanBank Ac. No.
<i>Ca. Phytoplasma mali</i> (Seemüller <i>et Schneider</i> , 2004)	ano	ano (Brčák <i>et al.</i> , 1972)	AJ542541
<i>Ca. Phytoplasma pyri</i> (Seemüller <i>et Schneider</i> , 2004)	ano	ano (Blattný <i>et Váha</i> , 1974)	AJ542543
<i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> (Seemüller <i>et Schneider</i> , 2004)	ano	ano (Blattný 1977)	AJ542544
<i>Ca. Phytoplasma spartii</i> (Marcone <i>et al.</i> , 2004)	ano	ne	X92869
<i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> (Marcone <i>et al.</i> , 2004)	ano	ne	X76431
<i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> (Marcone <i>et al.</i> , 2004)	ne	ne	AY135523

Nejvýznamnějším zástupcem skupiny 16 SrX je *Candidatus Phytoplasma mali*, která způsobuje vážné onemocnění jabloní známé jako proliferaci jabloně (Seemüller *et al.*, 1994). Tento patogen může rovněž napadat peckoviny (Lee *et al.*, 1995). Skupina proliferace jabloně však zahrnuje i jiné fytoplazmy zodpovědné za onemocnění ovocných stromů v Evropě. Jsou to především *Ca. Phytoplasma prunorum*, způsobující evropskou žloutenku peckovin, a *Ca. Phytoplasma pyri*, která je příčinou chřadnutí hrušně (Seemüller *et al.*, 1994).

Tato diplomová práce se zabývá pouze fytoplazmou evropské žloutenky peckovin a fytoplazmou proliferace jabloně, proto bude dále uvedena charakteristika pouze těchto dvou mikroorganismů.

3.3 *Candidatus Phytoplasma prunorum*

Fytoplazma, způsobující onemocnění známé jako evropská žloutenka peckovin, byla detekována v řadě evropských zemích, například ve Francii, Itálii, Německu, Rumunsku, Řecku, Španělsku, Švýcarsku a v neposlední řadě i v České republice (EPPO, 1996b). Její přítomnost byla zjištěna i v Turecku (Jarausch *et al.*, 2000)

Jejími hlavními hostiteli jsou ovocné stromy rodu *Prunus*, a to především meruňka (*Prunus armeniaca*), broskvoň (*Prunus persica*), trnka (*Prunus spinosa*), slíva (*Prunus insititia*), švestka domácí (*Prunus domestica*) a slivoň japonskou (*Prunus salicina*). Dále napadá mandloň obecnou (*Prunus dulcis*) a višň pilovitou (*Prunus serrulata*) (Seemüller *et al.*, 1998). Na základě PCR-RFLP analýz byl tento patogen zjištěn i v mnoha dalších druzích rodu *Prunus*. Dále může přirozeně infikovat některé plevele, jako například svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*) nebo troskut prstnatý (*Cynodon dactylon*) (Németh, 1986).

3.3.1 Příznaky evropské žloutenky peckovin

Nejlépeší doba pro detekci příznaků napadení ESFY je před kvetením stromů a na konci léta, ale symptomy onemocnění lze pozorovat v průběhu celého roku. Nejvýraznějším příznakem je výrazná zakřivenost infikovaných stromů. Listy infikovaných stromů jsou často svinuté s mírnou až silnou žloutenkou. Zpočátku jsou modifikovány jen listy na jednotlivých větvích, postupně se však tento symptom rozšiřuje do celé koruny.

Dále mohou mít listy zmenšené čepele nebo předčasně opadávat. Například u druhu *Prunus salicina* dochází k redukci velikosti listů a k jejich zbarvení do červena. Napadené stromy mají rovněž redukováný počet nasazovaných květů. Plody bývají menší, předčasně dozrávají a opadávají nebo mohou na větvích zasychat (EPPO, 1996b). Infikované stromy meruněk odumírají 12 - 24 měsíců po výskytu prvních příznaků. Z tohoto důvodu je evropská žloutenka peckovin významným onemocněním ovocných stromů, které výrazně ovlivňuje ekonomické výnosy z jejich pěstování. Ve Francii je fytoplazma evropské žloutenky peckovin zodpovědná za úhyn 60 - 70 % stromů meruněk (EPPO, 1996b).

3.3.2 Distribuce v rostlině

Distribuce fytoplazmy závisí na jejím hostiteli, interakcích s hostitelem a v neposlední řadě na fytoplazmě samotné. *Candidatus Phytoplasma prunorum* v průběhu celého roku osidluje kořeny napadeného stromu. Dále se může vyskytovat v jeho vrcholových částech a to i během zimy (Seemüller *et al.*, 1998), což potvrdili svými pokusy i Jarausch *et al.* (1999). Tímto se ESFY odlišuje od proliferace jabloně, která zimní období přetrvává především v kořenech.

3.3.3 Způsoby přenosu

Fytoplazma evropské žloutenky peckovin může být přenesena z jednoho stromu na druhý očkováním a roubováním. Tento způsob přenosu je možný v průběhu celého roku, protože ESFY přežívá ve vrcholových částech stromu i v zimě (Seemüller *et al.*, 1998; Jarausch *et al.*, 1999). Doposud nebyl prokázán přenos semeny. Nečas *et al.* (2008) sice pomocí PCR prokázali přítomnost ESFY v semenech pocházejících z napadených stromů, nicméně tato semena vykazovala 4,5x nižší životaschopnost a 7x nižší klíčivost než semena pocházející ze zdravých stromů.

Významnějším způsobem přenosu je přenos pomocí vektora. V případě *Ca. Phytoplasma prunorum* se jedná o meru *Cacopsylla pruni*, která tohoto patogena přenáší perzistentně.

3.4 *Candidatus Phytoplasma mali*

Fytoplasma proliferace jabloně je rozšířena téměř po celé Evropě, dále také v Sýrii a v Turecku. Jejím hlavním hostitelem je jabloň domácí (*Malus domestica*), přičemž jednotlivé odrůdy vůči ní vykazují různou citlivost. Mezi nejvíce citlivé odrůdy patří například Florina a Prima (Loi *et al.*, 1995) a mezi tolerantní například Spartan a Wealthy (Németh, 1986). K dalším hostitelům se řadí *Dahlia cultorum* (Kaminska *et Sliwa*, 2008), *Prunus avium*, *Prunus armeniaca* a *Prunus domestica* (Mehle *et al.*, 2006). Tato fytoplasma může být uměle přenesena na různé druhy rodu *Malus* (Németh, 1986).

3.4.1 Příznaky proliferace jabloně

Příznaky onemocnění proliferace jabloně jsou značně variabilní a často se projevují jen v některých částech koruny. Mezi typické příznaky patří tvorba metlovitých větví, přičemž boční výhony metel svírají ostrý úhel s terminálem. Dále se u infikovaných stromů vyskytují zvětšené palisty mající charakter malého listu. Typické jsou také malé zakulacené listy s nepravidelným vroubkováním. Důležité je pozdní a opakované kvetení, které se podepisuje i na snížení kvality a množství plodů. Napadené stromy mohou rovněž odumírat (EPPO, 1996a).

3.4.2 Distribuce v rostlině

Bylo zjištěno, že distribuce *Ca. Phytoplasma mali* v napadených stromech není během roku konstantní (Schaper *et Seemüller*, 1982). Seemüller *et al.* (1984) uvádějí, že v zimních měsících dochází ke snižování koncentrace fytoplazmy v kmeni infikovaného stromu v důsledku degradace sítkovic. Baric *et al.* (2011) zjistili, že v této době je největší koncentrace fytoplazmy v kořenech. Ke znovuosídlení kmene fytoplazmou dochází v dubnu až květnu a maximálních koncentrací v kmeni fytoplasma dosahuje koncem léta. Během jara se fytoplasma nevyskytuje ve vrcholových částech rostlin, maximálních hodnot v těchto místech dosahuje v červenci až prosinci (Pedrazzoli *et al.*, 2008), přičemž tento fakt není možno vysvětlit teplotní citlivostí patogena, protože bez problémů přežívá i při teplotách + 4 až - 20 °C (Seemüller *et al.*, 1984). Distribuce fytoplazmy ve stromech je však ovlivněna vyššími teplotami. Ve Francii bylo zjištěno, že infikované stromy vykazují symptomy onemocnění při teplotách 21 až 25 °C, ale při teplotách 29 až 32 °C jsou

symptomy potlačeny a fytoplazma osidluje pouze kořeny. Snížení teplot vede k opětovnému osídlení kmene patogenem (Ducroquet *et al.*, 1986).

3.4.3 Způsoby přenosu

Existují dva způsoby přenosu proliferace jabloně. První způsob je přenos pomocí roubů nebo oček, tedy vegetativní (Seidl *et Komarkova*, 1974). Druhým a významnějším způsobem je přenos pomocí vektorů, kterými jsou především *Cacopsylla melanoneura* a *Cacopsylla picta* (Seemüller, 1990).

Vektoři proliferaci jabloně jsou charakterističtí perzistentním přenosem tohoto patogena. Přezimující dospělci na jaře migrují ze svých zimovišť do ovocných sadů, kde v průběhu června a července produkují novou generaci (Mattedi *et al.*, 2008). *Ca. Phytoplasma mali* je přenášena pouze dospělci, přenos larvami nebyl potvrzen (Tedeschi *et Alma*, 2004).

3.5 Vztah fytoplazma – vektor

Řád Hemiptera zahrnuje tři podřády, a to *Heteroptera* (ploštice), *Sternorrhyncha* (mšicosaví) a *Auchenorrhyncha* (křísi). Do podřádu *Sternorrhyncha* spadá, mimo jiné, i nadčeleď *Psylloidea* (mery) zahrnující zhruba tři tisíce celosvětově rozšířených druhů včetně zhruba čtyř set druhů vyskytujících se v Evropě (Burckhardt, 1994). *Psylloidea* zahrnují šest čeledí včetně čeledi *Psyllidae* (merovití), do které je řazen rod *Cacopsylla*, zahrnující všechny důležité vektory fytoplazem napadající ovocné stromy, a to i *Cacopsylla melanoneura*, *C. picta* a *C. pruni*.

Pro determinaci nejvýznamnějších zástupců rodu *Cacopsylla* spp. bylo zřízeno webové rozhraní www.psyllidkey.info (Burckhardt *et al.*, 2008), které je v současnosti dostupné v anglickém a německém jazyce.

Vektorem fytoplazem je bodavě savý hmyz, který fytoplazmu nasává spolu se šťávou z floému rostlin, která je jeho potravou. Vektor může fytoplazmu přenést až po uplynutí inkubační periody (Carraro *et al.*, 2011). Délka inkubační, neboli latentní, periody se pohybuje nejčastěji od dvou do čtyř týdnů (ale může trvat až 80 dní) a je závislá na teplotě (Murrall *et al.*, 1996). Během latentní periody dochází k namnožení fytoplazmy

a její cirkulaci v těle vektora. Tento patogen se během nasávání rostlinných šťáv dostává do epitelu dutiny ústní, kde se pomnoží. Posléze se dostává do tělní dutiny a hemolymfy, kde se dále pomnožuje. Aby byl přenos patogena úspěšný, musí se fytoplazma dostat do slinných žláz hmyzu, odkud se během sání šťáv dostane do nového hostitele (Tsai, 1979), přičemž zde musí její množství dosáhnout dostatečně vysoké koncentrace.

Vliv fytoplazmy na vektora je značně variabilní a je určen druhem vektora, vnějšími faktory prostředí, a to především teplotou. Fytoplazma může mít na svého vektora negativní nebo pozitivní vliv, jako je tomu například u fytoplazmy žloutenky aster a vektora *Macrosteles quadrilineatus*. Právě u samiček tohoto vektora dochází ke zvýšení plodnosti a prodloužení délky jejich života (Beanland *et al.*, 2000).

3.6 Biologie čeledi *Psyllidae*

Většina mer, a to larvy i dospělci, se živí nasáváním šťáv z floému rostlin, přičemž mají určité potravní preference. Nejčastěji jsou mery monofágní, což znamená, že preferují pouze jediný rostlinný druh, mohou být však i oligofágní nebo polyfágní (Ossiannilsson, 1992). Dospělí jedinci jsou většinou schopni dočasně napadat i jiné, než-li preferované, rostliny.

Drtivá většina druhů čeledi merovitých je typická pohlavním rozmnožováním, jsou však známy i případy partenogeneze (Hodkinson, 1974). Mery kladou podlouhlá vajíčka do rostlinných pletiv a to, v závislosti na druhu, na nové pupeny, do kůry nebo na listy, kde způsobují deformaci čepele. Larvy prochází pěti vývojovými stádii, během kterých jsou dorzoventrálně zploštělé. Jižní a tropické druhy čeledi *Psyllidae* jsou polyvoltinní, což znamená, že mají během roku několik potomstev. Druhy mírného pásu jsou naopak bivoltinní či univoltinní. Tyto druhy přezimují jako vajíčka, larvy nebo dospělci na svých zimovištích a na jaře se vrací ke svým hostitelům (Burckhardt, 1994).

Důležité ulivoltinní druhy, jako jsou *Cacopsylla melanoneura*, *C. picta* a *C. pruni*, přezimují jako dospělci a obligátně střídají své rostlinné hostitele pro přezimování a reprodukci (Čermák *et* Lauterer, 2007). U těchto druhů bylo přezimování pozorováno ve vyšších nadmořských výškách na jehličnanech, přičemž migrace na zimoviště a zpět je

přímá a může probíhat i na dlouhé vzdálenosti, jako například u *C. pruni*, kdy může být délka migrace až 27 km (Thebaud *et al.*, 2009).

Současné studie ukazují, že chemické látky vylučované hostitelskými rostlinami ovlivňují migrační chování mer. Kupříkladu migrace *C. melanoneura* mezi hostitelskými rostlinami koresponduje se změnou preferencí k rostlinám během životního cyklu této mery (Mayer *et Gross*, 2007). Gross *et Mekonen* (2005) zjistili, že pachy vylučované rostlinami ovlivňují chování i *C. picta* (monofágní druh) a *C. melanoneura* (oligofágní druh). Bylo zjištěno, že fytoplazmou napadené stromy jabloní jsou pro *C. picta* atraktivnější, než stromy zdravé, za což jsou zodpovědné právě specifické látky vylučované infikovanými stromy (Mayer *et al.*, 2008).

3.7 Vektoři *Candidatus Phytoplasma prunorum*

Jako jediný vektor fytoplazmy evropské žloutenky peckovin byla označena *Cacopsylla pruni* (Scopoli). *C. pruni* je druh vyskytující se v téměř celé Evropě (Lauterer, 1999) a střední Asii.

Tato mera je oligofágní druh žijící na rostlinách rodu slivoní (*Prunus* spp.). Během roku vyprodukuje jedinou generaci a její dospělci přezimují na jehličnanech. Na konci zimy dospělci migrují zpět do sadů na stromy *Prunus* spp., kde se rozmnoží. Nová generace v sadech zůstává až do začátku července, kdy odlétá zpět na zimoviště (Carraro *et al.*, 2001).

3.8 Vektoři *Candidatus Phytoplasma mali*

V současnosti jsou známi dva vektoři fytoplazmy proliferace jabloně, a to *Cacopsylla picta* a *C. melanoneura* (Foerster, 1848).

C. picta je rozšířena pouze v Evropě jakožto monofágní druh žijící na jabloních (*Malus* spp.). Během roku vyprodukuje pouze jednu generaci, jejíž dospělci přezimují na jehličnanech. Na jaře se *C. picta* vrací ze zimovišť zpět na jabloně, kde klade vajíčka.

Jedinci nové generace žijí na jabloních až do začátku července, kdy je opouštějí jako dospělci (Tedeschi *et al.*, 2009).

Cacopsylla melanoneura je oligofágní druh žijící na rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*), především na hlohu (*Crataegus* spp.), jabloni (*Malus* spp.) a hrušni (*Pyrus* spp.). Životní cyklus je stejný jako u *C. picta* s tím rozdílem, že dospělci přilétají do sadů dříve a stejně tak nová generace dříve odlétá na zimoviště (Mattedi *et al.*, 2008).

Na většině studovaných územích se vyskytovaly *C. picta* a *C. melanoneura* společně nebo se zde vyskytovala pouze *C. melanoneura* (Jarausch *et al.*, 2003; Mattedi *et al.*, 2008; Tedeschi *et al.*, 2002). Porovnáním významnosti těchto dvou vektorů se věnovalo několik studií, které však dospěly ke zcela rozdílným výsledkům. V Německu a severní Itálii byla jako efektivnější vektor *Ca. Phytoplasma mali* označena *C. picta* (Jarausch *et al.*, 2003; Carraro *et al.*, 2008), naopak v Aosta Valley v Itálii byla jako hlavní vektor označena *C. melanoneura* (Tedeschi *et al.*, 2002). Navíc v Německu bylo zjištěno (Mayer *et al.*, 2009) že *C. melanoneura* fytoplazmu proliferace jabloně není schopna přenést.

Fytoplazma proliferace jabloně je jedinou fytoplazmou, u které byl zaznamenán přenos pomocí mer i kříšů. Bylo zjištěno, že tato fytoplazma může být, alespoň v experimentálních podmínkách, přenesena pomocí křísa *Fieberiella florii* (Tedeschi *et al.*, 2006). Avšak význam přenosu pomocí *F. florii* zůstává diskutabilní.

3.9 Využití real-time PCR ve studiu fytoplazem

Real-time PCR lze při studiu fytoplazem použít pro detekci a molekulárně epidemiologická studia. Jedná se o metodu, při které dochází ke kontinuální amplifikaci a detekci přírůstku amplikonů během každého cyklu. Detekce fytoplazem je obvykle prováděna pomocí konvenční PCR s primery navrženými na 16S rRNA. Kvůli jejich nízké koncentraci ve vzorcích je ale často nutné použít nested PCR. V poslední době se pro jejich detekci využívá i metoda real-time PCR, která má srovnatelnou citlivost s nested PCR a oproti konvenční PCR má řadu výhod: je přesnější, rychlejší, má větší dynamický rozsah a je při ní nižší riziko kontaminací. Kromě detekce je možno real-time PCR uplatnit při studiu epidemiologie fytoplazem, například při stanovení infekivity hmyzích vektorů a hodnocení rezistence rostlin vůči fytoplazmám.

Vývojem postupů detekce fytoplazem pomocí real-time PCR se v posledních letech zabývala řada pracovních skupin. Pro urychlení detekce *Candidatus Phytoplasma* mali navrhli Baric *et al.* (2004) postup využívající multiplex real-time PCR, během které dochází k simultánní amplifikaci 16S rRNA genu patogena a chloroplastového genu jabloně. Pro urychlení diagnostiky a zjednodušení studia *Candidatus Phytoplasma prunorum* navrhli Yvon *et al.* (2009) postup detekce, který lze uplatnit pro zástupce rodu slivoní i vektora *Cacopsylla pruni*. Hodgetts *et al.* (2009) se zabývali rutinní diagnostikou fytoplazem a vytvořili postup pro univerzální a skupinově specifickou detekci, který využívá primery a sondy navržené na 23S rRNA. Univerzální detekci fytoplazem vyvíjeli i Oberhänsli *et al.* (2011). Jejich postup je založen na simultánní detekci fytoplazmy a 18S rRNA genu hostitele pomocí TaqMan sond.

Souběžně s použitím real-time PCR pro detekci fytoplazem se tato metoda začala používat i pro jejich kvantifikaci, a to v rostlinách i hmyzích vektorech. Christensen *et al.* (2004) studovali množství fytoplazem v rostlinách a jejich lokalizaci *in situ* (s využitím metody bioimaging). Torres *et al.* (2005) navrhli postup pro citlivou a simultánní detekci a kvantifikaci fytoplazem skupiny 16SrX v rostlinách a dále srovnávali citlivost detekce pomocí konvenční PCR, nested PCR a real-time PCR. Výsledkem bylo zjištění, že citlivost nested a real-time PCR je srovnatelná. Torres *et al.* (2010) aplikovali postup kvantifikace ESFY v různých kultivarech švestky. Martini *et al.* (2011) studovali závislost vnějších příznaků infekce hostitelských stromů rodu *Prunus* na koncentraci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin a zjistili, že určitá míra korelace existuje.

Jarausch *et al.* (2004) vypracovali postup kvantifikace *Candidatus Phytoplasma* mali v *Cacopsylla picta*. Stejný postup lze uplatnit i pro kvantifikaci v jabloních. Jarausch *et al.* (2007a) studovali koncentraci fytoplazmy proliferace jabloně v jedincích druhů *C. picta* a *C. melanoneura*, které odchytili v letech 2002 – 2007 v Německu, severní Francii a severním Švýcarsku. Došli k závěru, že je v těchto regionech AP přenášena pouze pomocí *C. picta* a tudíž zde *C. melanoneura* nemá jako vektor význam. Martini *et al.* (2007) navrhli postup pro simultánní detekci a kvantifikaci ESFY, kterou lze využít pro hostitelské rostliny i hmyzí vektory. Pedrazzoli *et al.* (2007) sledovali nárůst koncentrace AP v *C. picta* a *C. melanoneura* po jejich umělém odchovu na infikovaných jabloních. Stanovili, že zvýšení koncentrace fytoplazmy je výraznější u *Cacopsylla picta*. Thébaud *et al.* (2008) studovali změnu koncentrace fytoplazmy ve vektoru během jeho přezimování.

Pro studii použili jedince *C. pruni* odchytávané v letech 2002 – 2005 na zimovištích v jižní Francii (v nadmořských výškách 700 – 1 400 m). Došli k závěru, že se jedinci nové generace infikují fytoplazmou, pokud žijí na infikovaných rostlinách, ale v tuto chvíli ještě nejsou účinnými vektory fytoplazmy. Během období přezimování dojde k namnožení fytoplazmy ve vektorech, čímž se tito jedinci stanou účinnými vektory a po jejich návratu do ovocných sadů jsou schopni infikovat další rostliny. Rutinní kvantifikací fytoplazmy evropské žloutenky peckovin se zabývali Jarausch *et al.* (2010b). Navrhli postup použitelný u hmyzu i hostitelských rostlin. Jarausch *et al.* (2010a) zkoumali interakci *C. picta* a různých kmenů *Candidatus Phytoplasma mali*, a to na základě studia účinnosti akvizice a zmnožení fytoplazmy ve vektoru. Nejvyšší účinnost akvizice pro všechny kmény AP byla zjištěna u jedinců *C. picta* narozených na infikovaných jabloních. Účinnost zmnožení fytoplazmy ve vektorech se mezi jednotlivými kmény lišila.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Pro experimentální část práce byli použiti vektorři fytoplazem evropské žloutenky peckovin a proliferace jabloně, kteří byli roztríděni podle druhu (*Cacopsylla pruni*, *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura*) a pohlaví. Tito vektorři byli odchytáváni v letech 2006 – 2011 na zimovištích v obci Olšany (okr. Vyškov) a Bukovina (okr. Blansko). Determinaci a roztrídění odchycených jedinců provedl RNDr. Pavel Lauterer z Moravského zemského muzea v Brně.

U roztríděných vektorů byla pomocí metody nested PCR detekována přítomnost fytoplazmy a u druhu *Cacopsylla pruni* byla navíc provedena kvantifikace metodou real-time PCR.

4.2 Izolace DNA

Izolace DNA z odchycených jedinců *Cacopsylla* spp. byla provedena pomocí kitu Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA).

K jednomu jedinci vektora v 1,5ml zkumavce bylo přidáno 100 μ l pufru *Nucleic lysis solution* a hmyz byl homogenizován pomocí umělohmotného homogenizátoru. Lyzát byl inkubován 15 min při 65 °C (zhruba v polovině inkubace byla směs protřepána). Před dalším zpracováním byla směs 5 min ponechána při pokojové teplotě. Poté byly k lyzátu přidány 2 μ l roztoku *RNase solution* a směs byla promíchána převrácením zkumavky (25x) a krátce stočena ve stolní centrifuze. Lyzát byl inkubován 15 min při 37 °C, po této době byl opět 5 min ponechán při pokojové teplotě následně bylo přidáno 34 μ l roztoku *Protein precipitation solution*. Po přidání roztoku byla směs 20 s vortexována (při 1 600 rpm), a poté byly vzorky 5 min vychlazeny na ledu. Posléze byly vzorky 4 min centrifugovány při 13 000 rpm a supernatant přenesen do nových 1,5ml zkumavek se 100 μ l izopropanolu. Zkumavky byly promíchány jejich převrácením (5x) a umístěny do mrazáku.

Následující den byly vzorky 1 min centrifugovány při 13 000 rpm a supernatant odstraněn. K peletu bylo přidáno 200 μ l 70% ethanolu, zkumavky byly opatrně promíchány

převrácením (1x) a opět 1 min centrifugovány při 13 000 rpm. Poté byl supernatant vylit a pelet byl 30 min vysoušen při 45 °C v rotační vakuové odparce. Nakonec byla izolovaná DNA přes noc rozpuštěna ve 20 µl roztoku *Rehydration solution* v lednici a příští den přemístěna do mrazáku, kde byla uchovávána před dalším zpracováním.

4.3 Detekce fytoplazem ve vektorech pomocí nested PCR

Pro detekci fytoplazem v jedincích *Cacopsylla spp.* byla použita metoda nested PCR za použití primerů amplifikujících segmenty genu pro 16S rRNA.

Nejprve byla připravena reakční směs pro první fázi reakce (viz Tab. 2), při které byly použity primery P1/P7, a byla spuštěna PCR dle podmínek definovaných pro tento pár primerů (viz Tab. 3). Produkty první PCR reakce byly 40x naředěny a přidány do směsi pro druhou fázi reakce (viz Tab. 2) obsahující vnitřní primery R16F2/R16R2. Tato reakce proběhla dle podmínek uvedených v Tab. 4.

Tab. 2: Reakční směs pro nested PCR s primery P1/P7 a R16F2/R16R2.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Reakční směs pro kombinaci primerů P1/P7 a R16F2/R16R2
		Pipetuj na 1 test
Pufr (s barvivem)	5 x	4 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	1,2 µl
Voda		11,1 µl
dNTPs	2 mmol/l	1 µl
Primer f	20 pmol/ml	0,25 µl
Primer r	20 pmol/ml	0,25 µl
Go Taq polymerasa	5 U/ml	0,2 µl
Objem reakční směsi		18 µl
Objem vzorku		2 µl
Celkový objem reakce		20 µl

Sekvence primerů P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995):

P1 (5' - AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T - 3')

P7 (5' - CGT CCT TCA TCG GCT CTT - 3')

Sekvence primerů R16F2/R16R2 (Lee *et al.*, 1995):

R16F2 (5' - ACG ACT GCT AAG ACT GG - 3')

R16R2 (5' - TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G - 3')

Tab. 3: Teplotní a časový profil PCR reakce s primery P1/P7.

95 °C	2 min	
95 °C	1 min	
50 °C	2 min	35 cyklů
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	

Tab. 4: Teplotní a časový profil PCR reakce s primery F2/R2.

95 °C	2 min	
95 °C	1 min	
50 °C	1 min	35 cyklů
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

4.4 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu

R16F2/R16R2 produkty byly vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu, čímž byla detekována přítomnost fytoplazem ve vzorcích.

Nejprve byl připraven 1% agarózový gel smícháním a následným rozvařením 1 g agarózy a 100 ml pufru TAE 1x. Do zhruba 50 ml lehce vychladlého gelu byly přidány 3 µl barviva GelRed (Biotium, USA), a poté byl gel vylit do vaničky pro horizontální elektroforézu.

Do první jamky ztuhlého agarózového gelu byly nanесeny 2 µl standardu molekulové váhy (100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Canada) a do následujících jamek po 5 µl PCR produktů. Elektroforéza byla spuštěna zhruba na půl hodiny při 80 V. Výsledek byl vyhodnocen pomocí UV transluminátoru.

Identifikace fytoplazem v souboru náhodně vybraných jedinců každého studovaného druhu byla provedena pracovníky Laboratoře molekulární biologie mikroorganismů pomocí PCR-RFLP analýzy.

Rozdíly v počtech pozitivních jedinců odchycených v jednotlivých letech byly vyhodnoceny pomocí T-testu v programu STATISTICA.

4.5 Příprava standardu pro kvantitativní PCR

Aby mohla být provedena kvantifikace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v jedincích *Cacopsylla pruni*, musel být připraven standard pro kvantitativní PCR, jehož postupným ředěním byla vytvořena kalibrační křivka.

4.5.1 PCR amplifikace ribozomálního segmentu ECA1/ECA2

Pro přípravu standardu byl použit vzorek číslo 3308 (Olimp/2/08; odebrán dne 7. března 2008 v semenném sadu meruněk Zahradnické fakulty Mendlovy univerzity v Lednici na Moravě), který byl izolován z příznakového stromu meruňky. Vzhledem k tomu, že byl připravován standard pro kvantifikaci ESFY, byly použity primery ECA1/ECA2, které jsou specifické právě pro fytoplazmu evropské žloutenky peckovin.

Dle rozpisu v Tab. 5 byla připravena reakční směs pro amplifikaci fragmentu ECA1/ECA2, a poté byla spuštěna PCR reakce dle podmínek uvedených v Tab. 6.

Tab. 5: Reakční směs pro PCR s primery ECA1/ECA2.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Pipetuj na 1 test
Pufř	10 x	2 µl
MgCl ₂	25 mmol/l	2,4 µl
Voda		11,3 µl
dNTPs	2 mmol/l	1 µl
Primer ECA1	20 pmol/µl	0,1 µl
Primer ECA2	20 pmol/µl	1 µl
aTaq polymerasa	5 U/µl	0,2 µl
Objem reakční směsi		18 µl
Objem vzorku		2 µl
Celkový objem reakce		20 µl

Sekvence primerů ECA1/ECA2 (Jarausch *et al.*, 1998):

ECA1 (5' - AAT AAT CAA GAA CAA GAA GT - 3')

ECA2 (5' - GTT TAT AAA AAT TAA TGA CTC - 3')

Tab. 6: Teplotní a časový profil PCR reakce s primery ECA1/ECA2.

95 °C	2 min	
95 °C	15 s	
54 °C	30 s	40 cyklů
69 °C	30 s	
72 °C	10 min	

4.5.2 Elektroforéza na 1% agarózovém gelu

PCR produkt byl po obarvení bromfenolovou modří (1 μ l BFM na 5 μ l produktu) půl hodiny separován při 80 V na 1% agarózové gelu s přidavkem 2 μ l ethidium bromidu (koncentrace 10 mg/1 ml).

4.5.3 Purifikace PCR produktu

Z agarózového gelu byl tento PCR produkt (fragment ECA1/ECA2) izolován pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit dle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Nejdříve byla pomocí sterilního skalpelu pod UV transluminátorem vyříznuta část gelu obsahující PCR produkt. Vyříznutý gel byl umístěn do 1,5ml mikrozkušavky a byla zjištěna jeho hmotnost. Do téže zkumavky byl přidán pufr QG odpovídající trojnásobku hmotnosti vyříznutého gelu (1 μ l ~ 1 μ g). Mikrozkušavka s vyříznutým gelem a QG pufrem byla inkubována 10 min na vodní lázni při 50 °C. Během inkubace byla každé 2 - 3 minuty mikrozkušavka vortexována, aby se gel lépe rozpouštěl. Po úplném rozpuštění gelu bylo zkontrolováno, zda barva směsi je žlutá, stejně jako QG pufr bez rozpuštěného gelu. Ke vzorku bylo přidáno ekvivalentní množství isopropanolu vůči hmotnosti vyříznutého gelu (1 μ l ~ 1 μ g) a obsah zkumavky byl promíchán. QIAquick kolonka byla umístěna do 2ml sběrné zkumavky. Na QIAquick kolonku byl napipetován celý vzorek a kolona byla centrifugována 1 min při 5 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a kolona umístěna zpět do sběrné zkumavky. Na kolonku bylo napipetováno 0,5 ml QG pufru a centrifugováno 1 min při 5 000 rpm, čímž došlo k odstranění posledních zbytků agarózy. Na kolonku bylo přidáno 0,75 ml PE pufru, 1 min centrifugováno při 5 000 rpm, čímž došlo k promytí kolony. Opět byl vylit obsah sběrné zkumavky a kolona ve sběrné zkumavce byla opět centrifugována 1 min při 13 000 rpm. QIAquick kolonku byla umístěna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Pro eluci DNA bylo přidáno 50 μ l EB pufru na střed membrány QIAquick kolonky a centrifugováno 1 min při 13 000 rpm.

Přečištěný PCR produkt byl dále ligován do pGem-T plazmidu (pGEM-T Vector Systém, Promega, USA) dle modifikovaného protokolu výrobce.

4.5.4 Ligace PCR produktu

Přečištěný PCR produkt byl dále ligován do pGem-T plazmidu (pGEM-T Vector Systém, Promega, USA) dle modifikovaného protokolu výrobce.

Do 0,2ml mikrozkušavky bylo napipetováno 5 μ l ligačního pufru, 1 μ l T4 DNA ligasy, 0,5 μ l pGem-T plazmidu a 3,5 μ l přečištěného PCR produktu. Ligace probíhala přes noc při 4 °C.

4.5.5 Transformace bakterií *E. coli*

Pro namnožení rekombinantního plazmidu pGem-T byly použity kompetentní buňky *E. coli* (kmen JM109). Transformace proběhla teplotním šokem dle protokolu výrobce.

Do 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno 75 μ l kompetentních buněk a 5 μ l ligovaného produktu. Směs byla inkubována 20 min na ledu, poté byla směs vystavena teplotnímu šoku 42 °C po dobu 45 s a přenesena zpět na led. Po 2 minutách bylo přidáno 850 μ l živného SOC média a vzorky byly ponechány 1,5 hod při 37 °C na třepačce. Směs byla zkoncentrována centrifugací při 4 000 rpm po dobu 2 min, a poté byl odstraněn supernatant. Pelet byl resuspendován v 50 μ l kultivačního média. Bakteriální suspenze byla následně rozetřena na povrch LB média s přídavkem ampicilinu (100 μ g ampicilinu na 1 ml média), X – Galu a IPTG (X – Gal a IPTG byly do média přidány k vizualizaci úspěšného proběhnutí transformace a vnesení vektoru do bakterií). Buňky byly inkubovány přes noc při 37 °C v termostatu.

Druhý den byly bílé bakteriální kolonie inokulovány na čerstvé LB médium obsahující ampicilin a opět inkubovány přes noc při 37 °C. Na povrchu média v kultivační misce narostly transformované bakteriální kolonie bílé a modré barvy.

Skríning pozitivních (bílých) kolonií byl proveden pomocí PCR reakce s využitím primerů M13f a M13r, čímž byla detekována velikost výsledného PCR produktu. Reakční směs byla připravena dle rozpisu v Tab. 7. PCR reakce probíhala dle profilu v Tab. 8. Jako vzorek byly použity testované kolonie *E. coli*.

Tab. 7: Reakční směs pro PCR s primery M13f/M13r.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Pipetuj na 1 test
Pufř	5 x	4 μ l
MgCl ₂	25 mmol/l	1,2 μ l
Voda		12,2 μ l
Nukleotidy	2 mmol/l	2 μ l
Primer M13f	20 pmol/ μ l	0,2 μ l
Primer M13r	20 pmol/ μ l	0,2 μ l
Go Taq polymerasa	5 U/ μ l	0,2 μ l
Objem reakční směsi		20 μ l
Objem vzorku		0 μ l
Celkový objem reakce		20 μ l

Sekvence primerů M13r/M13f (Invitrogen, 1999):

M13f (5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3')

M13r (5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3')

Tab. 8: Teplotní a časový profil PCR reakce s primery M13f/M13r.

94 °C	7 min	
94 °C	1 min	
55 °C	2 min	35 cyklů
72 °C	3 min	
72 °C	7 min	

Přítomnost PCR produktu byla vyhodnocena elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Z pozitivních kolonií byly vytvořeny konzervy, které slouží k dlouhodobému uchování rekombinantních bakteriálních klonů.

Bakterie byly kultivovány v tekutém LB/Amp médiu za stálého třepání při 37 °C přes noc. Druhý den bylo 850 μ l bakteriální suspenze přeneseno do sterilní mikrozskumavky, do které bylo přidáno 150 μ l glycerolu (do konečné koncentrace 15 %). Konzervy byly uloženy v hluboko mrazicím boxu při – 80 °C.

4.5.6 Izolace plazmidu

Pro následující práci bylo nutné z transformovaných bakterií izolovat plazmid s vloženým fragmentem ECA1/ECA2. Izolace byla provedena pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu dle protokolu výrobce (QIAquick Spin Handbook 07/2002; QIAGEN, Germany).

Do 2ml mikrozkušavky bylo odebráno 1,5 ml transformovaných buněk *E. coli* v LB médiu a následně centrifugováno 3 min při 6 000 rpm. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a buňky byly resuspendovány ve 250 µl pufru P1. Bylo přidáno 250 µl pufru P2 a okamžitě promícháno převrácením zkumavky (15x). Bylo přidáno 350 µl pufru N3 a ihned promícháno převrácením zkumavky (10x). Suspenze byla centrifugována 10 min při 13 000 rpm. Supernatant byl přepipetován na QIAprep Spin kolonu. Kolona byla centrifugována 60 s při 13 000 rpm a filtrát odstraněn. Kolona byla promyta přidáním 0,5 ml pufru PB, centrifugována 60 s při 13 000 rpm. Kolona byla promyta přidáním 0,75 ml pufru PE, centrifugována 60 s při 13 000 rpm. Kolona byla centrifugována další minutu, čímž byl odstraněn zbytkový promývací pufr. QIAprep Spin kolona byla umístěna do čisté 1,5ml zkumavky a do jejího středu bylo napipetováno 50 µl pufru EB, který z kolony uvolnil izolovanou DNA. Kolona s EB pufrem byla ponechána minutu stát a poté byla 1 min centrifugována při 13 000 rpm.

Po izolaci plazmidu bylo provedeno měření koncentrace a čistoty pomocí Nanodropu a následně byl stanoven počet kopií templátu v 1 µl vzorku pomocí vzorce:

$$\text{počet kopií DNA} = (\text{naměřená koncentrace plazmidu [ng/}\mu\text{l]} \times 6,022 \cdot 10^{23}) / (\text{počet bází klonovaného úseku} \times 1 \cdot 10^9 \times 650)$$

Pozn. vzorec pro výpočet byl získán z webového odkazu:

<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>

Po zjištění počtu kopií templátu ve vzorcích byla vytvořena zředovací řada ($1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^1$ kopií v 1 µl vzorku), která sloužila jako základ pro vytvoření kalibrační křivky metodou real-time PCR.

4.6 Absolutní stanovení koncentrace ESFY ve vzorcích

Pro absolutní stanovení koncentrace fytoplazmy v jedincích *Cacopsylla pruni* byla metodou real-time PCR nejprve vytvořena kalibrační křivka ($1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^1$ kopií v $1 \mu\text{l}$), a poté byly analyzovány jednotlivé vzorky pocházející z jedinců tohoto vektora.

Byla připravena reakční směs pro real-time PCR dle rozpisu v Tab. 9 a spuštěna reakce dle podmínek v Tab. 10. Vyhodnocení bylo provedeno programem Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

Tab. 9: Reakční směs pro real-time PCR s primery ECA1/ECA2.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Pipetuj 1 test
5x My Taq Buffer	5 x	4 μl
Voda		12 μl
Primer ECA1	20 pmol/ml	0,4 μl
Primer ECA2	20 pmol/ml	0,4 μl
SYBR Green		0,8 μl
My Taq polymerasa	5 U/ml	0,4 μl
Objem reakční směsi		18 μl
Objem vzorku		2 μl
Celkový objem reakce		20 μl

Tab. 10: Teplotní a časový profil PCR reakce s primery ECA1/ECA2 (Jarausch *et al.*, 2010).

95 °C	2 min	
95 °C	15 s	
54 °C	30 s	40 cyklů
69 °C	30 s	
72 °C	10 min	

4.7 Přístrojové vybavení laboratoře

Horizontální elektroforéza AGAGEL STANDARD

Mikrovlnná trouba

Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI, Labnet International, Inc.

Nanodrop 1000 SPECTROPHOTOMETER, Thermo Scientific

Program Microsoft Excel (součást softwaru Microsoft Office 2007), Microsoft

Software Rotor-Gene 6, Corbett Research

Sterilní box TELSTAR PV-100, Telstar

Termocyklér PTC-100, MJ Research

Termocyklér Rotor-Gene RG-3000A, Corbett Research

Termostat SM-30 CONTROL, Edmund Bühler GmbH

UV transluminátor G:BOX, Syngene

UV transluminátor MACRO VUE UVis-20, Hofer

Váhy AND EK-200G, A&D Co. Ltd.

Vakuová odparka SPD 111V SpeedVac®, Thermo Scientific

Vortex MS1 MINISHAKER, IKA®

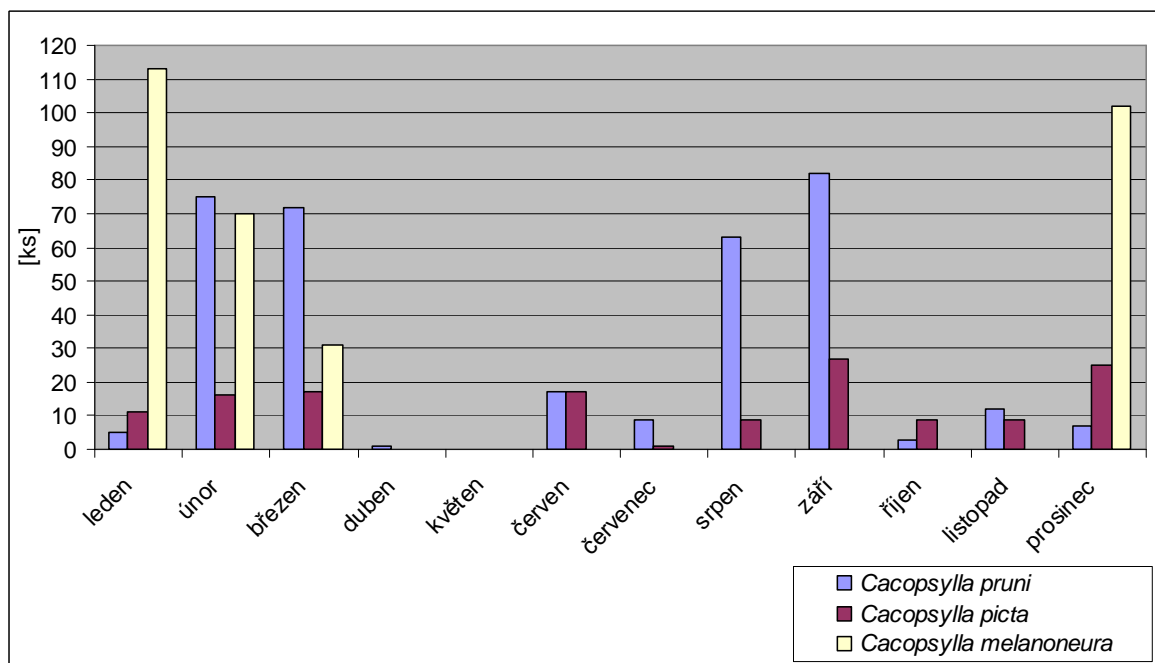
Zdroj stejnosměrného elektrického proudu Power Pack P 25, Biometra

5 Výsledky

5.1 Výskyt vektorů a detekce fytoplazem pomocí nested PCR

Detekce *Candidatus* Phytoplasma pruni (ESFY) a *Candidatus* Phytoplasma mali (AP) byla provedena celkem v 803 jedincích *Cacopsylla* spp. odchycených na zimovištích v letech 2006 – 2011. Ve vektoru *Cacopsylla pruni* byla detekována fytoplazma evropské žloutenky peckovin. Ve vektorech *C. picta* a *C. melanoneura* byla detekována fytoplazma proliferace jabloně. Počty jedinců odchycených v jednotlivých měsících v průběhu let 2006 až 2011 jsou uvedeny v následujícím grafu a tabulkách (Graf 1, Tabulky 11, 14 a 17). Na zimovištích se nejvíce vyskytoval druh *C. pruni* a *C. melanoneura*. Nejméně zastoupenou merou byla *C. picta*.

Graf 1: Počet jedinců *Cacopsylla* spp. odchycených na zimovištích v jednotlivých měsících v letech 2006 – 2011.



Pro detekci fytoplazem v jedincích studovaných vektorů byla použita metoda nested PCR s kombinací primerů P1/P7 a R16F2/R16R2 navrženou pro amplifikaci 16S rRNA genu fytoplazem. Produkty reakce byly vyhodnoceny na 1% agarózovém gelu. Přítomnost produktu R16F2/R16R2 o velikosti cca 1 200 bp (Lee *et al.*, 1995) značila výskyt fytoplazmy ve vektoru.

PCR-RFLP analýza provedená na náhodně vybraných jedincích *Cacopsylla* spp. potvrdila, že se v *C. pruni* vyskytovala pouze fytoplazma evropské žloutenky peckovin a v jedincích *C. picta* a *C. melanoneura* pouze fytoplazma proliferace jabloně.

5.1.1 Výskyt vektora *Cacopsylla pruni*

Pro studium bionomie vektora *Cacopsylla pruni* a fytoplazmy evropské žloutenky peckovin bylo použito 346 jedinců (189 samců a 157 samic) *C. pruni* odchycených na zimovišti v Olšanech. Počet samců a samic odchycených v jednotlivých měsících a letech je uveden v Tab. 11.

Tab. 11: Počty samců a samic *C. pruni* odchycených v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	0	0	1	4	-	-	-	-	-	-	1	4
únor	-	-	34	26	-	-	-	-	-	-	9	6	43	32
březen	1	3	6	7	35	15	-	-	-	-	2	3	44	28
duben	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	5	9	3	0	-	-	-	-	-	-	8	9
červenec	-	-	-	-	7	2	-	-	-	-	-	-	7	2
srpen	-	-	0	1	40	22	-	-	-	-	-	-	40	23
září	-	-	17	13	24	28	-	-	-	-	-	-	41	41
říjen	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
listopad	2	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	10
prosinec	2	3	-	-	-	-	-	-	0	2	-	-	2	5
celkem	5	16	63	59	110	71	0	0	0	2	11	9	189	157

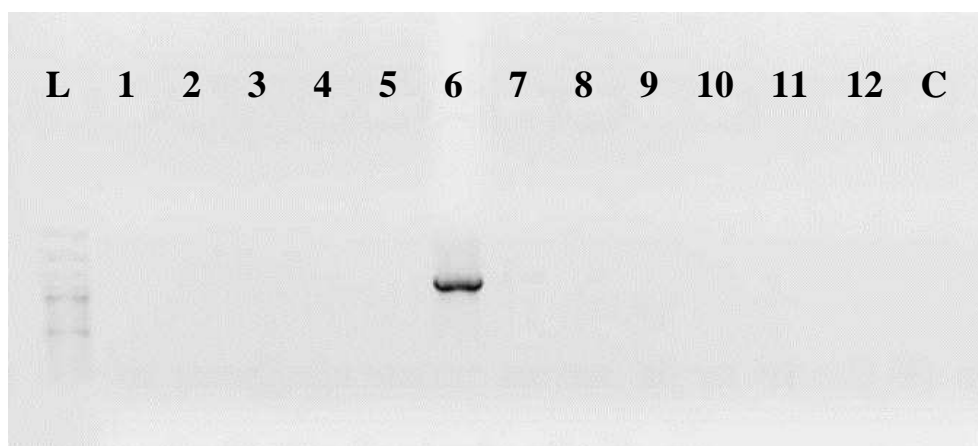
Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn.

V letech 2006 až 2011 nebyl zaznamenán zásadní rozdíl v počtu odchycených samců a samic. Během zimních měsíců byl, kvůli nízkým teplotám, odchyt spíše nahodilý. Odchyt mery kulminoval v měsíci únoru a březnu, kdy byla vlivem zvyšujících se teplot zvýšena její aktivita a nastala pasivní migrace do sadů. V období mezi dubnem a červencem bylo odchyceno pouze malé množství jedinců, protože toto období tráví jedinci rozptýleni v ovocných sadech. Druhá kulminace odchytu na přelomu srpna a září potvrzuje migraci *C. pruni* ze sadů zpět na zimoviště.

5.1.2 Detekce *Candidatus Phytoplasma prunorum* v jedincích *Cacopsylla pruni*

Detekce *Candidatus Phytoplasma prunorum* byla provedena u 346 jedinců *C. pruni*. Očekávaný produkt o velikosti cca 1 200 bp, který odpovídal specifickému amplikonu fytoplazmové DNA, byl detekován u 75 jedinců (příklad vyhodnocení – viz Obr. 1). Amplifikace nebyla zaznamenána u negativní kontroly. Počet samců a samic pozitivních na přítomnost fytoplazmy evropské žloutenky peckovin je uveden v Tab. 12. Procento pozitivních samců a samic je uvedeno v Tab. 13.

Obr. 1: Detekce fytoplazmy evropské žloutenky peckovin ve vektoru *Cacopsylla pruni*.



Legenda:

L: Standard molekulové hmotnosti (100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Canada).

1-12: Analyzovaní jedinci *C. pruni* – jako pozitivní byl vyhodnocen vzorek s číslem 6, ostatní vzorky byly vyhodnoceny jako negativní.

C: Negativní kontrola.

Tab. 12: Počet pozitivních samců a samic *C. pruni* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	-	-	0	2	-	-	-	-	-	-	0	2
únor	-	-	14	2	-	-	-	-	-	-	1	0	15	2
březen	0	3	1	0	10	5	-	-	-	-	0	0	11	8
duben	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	1	1
červenec	-	-	-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	5	2
srpen	-	-	-	0	6	2	-	-	-	-	-	-	6	2
září	-	-	6	2	3	4	-	-	-	-	-	-	9	6
říjen	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4
prosinec	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	0
celkem	1	7	22	5	24	15	0	0	0	0	1	0	48	27

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus.

Tab. 13: Procento pozitivních samců a samic *C. pruni* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		průměr	
	♂ ^a	♀ ^A	♂ ^a	♀	♂ ^a	♀ ^A	♂	♀	♂	♀ ^B	♂	♀ ^B	♂	♀
leden	-	-	-	-	0	50	-	-	-	-	-	-	0	50
únor	-	-	41	8	-	-	-	-	-	-	11	0	26	4
březen	0	100	17	0	29	33	-	-	-	-	0	0	11	33
duben	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
červen	-	-	20	11	0	-	-	-	-	-	-	-	10	11
červenec	-	-	-	-	71	100	-	-	-	-	-	-	71	100
srpen	-	-	-	0	15	9	-	-	-	-	-	-	15	5
září	-	-	35	15	13	14	-	-	-	-	-	-	24	15
říjen	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	50	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50	40
prosinec	0	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	0
průměr	17	47	23	5	21	41	-	-	-	0	6	0	21	23

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus; **a**: stejná písmena označují hodnoty, mezi nimiž není u samců statisticky průkazný rozdíl při $p = 0,95$; **A, B**: stejná písmena označují hodnoty, mezi nimiž není u samic statisticky průkazný rozdíl při $p = 0,95$; všechny hodnoty jsou uvedeny v procentech.

U samců byl zjištěn průkazně vyšší výskyt pozitivních jedinců v letech 2006, 2007 a 2008. U samic byl prokazatelně nejvyšší výskyt pozitivních jedinců v letech 2006 a 2008. Procento odchycených pozitivních samců a samic bylo v průběhu sledovaného období variabilní. V roce 2007 byl prokazatelně vyšší záchyt pozitivních samců než samic, nicméně v letech 2006 a 2008 byl prokazatelně vyšší záchyt pozitivních samic ($p = 0,95$) - viz Tab. 13.

Průměrné zastoupení pozitivních jedinců v průběhu sledovaných let bylo 22 %. Zastoupení pozitivních samců a samic bylo v průběhu roku srovnatelné – konkrétně 21 % samců a 23 % samic. Největší výskyt pozitivních mer byl detekován v červenci, kdy množství pozitivních samců dosáhlo 71 % a u samic dokonce 100 %, nicméně se jednalo o výsledky z malého sběru. Naopak žádný pozitivní jedinec nebyl detekován v dubnu, říjnu a prosinci, tedy v měsících s minimálním počtem odchycených jedinců.

5.1.3 Výskyt vektoru *Cacopsylla picta*

Pro studium bionomie vektoru *Cacopsylla picta* a fytoplazmy proliferace jabloně bylo použito 141 jedinců (63 samců a 78 samic) *C. picta* odchycených na zimovištích v Olšanech a Bukovině. Počet samců a samic odchycených v jednotlivých měsících a letech je uveden v Tab. 14.

Tab. 14: Počty samců a samic *C. picta* odchycených v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	1	1	6	3	-	-	-	-	-	-	7	4
únor	-	-	3	8	-	-	-	-	-	-	4	1	7	9
březen	0	0	0	4	3	6	-	-	-	-	2	2	5	12
duben	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	9	7	0	1	-	-	-	-	-	-	9	8
červenec	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-	0	1
srpen	-	-	2	2	1	4	-	-	-	-	-	-	3	6
září	-	-	7	11	3	6	-	-	-	-	-	-	10	17
říjen	-	-	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-	7	2
listopad	4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5
prosinec	7	6	-	-	-	-	-	-	4	8	-	-	11	14
celkem	11	11	29	35	13	21	0	0	4	8	6	3	63	78

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn.

Jedinců *Cacopsylla picta* bylo odchyceno podstatně méně (141 kusů) než jedinců *C. pruni* (346 kusů) a *C. melanoneura* (316 kusů). V jednotlivých odchycích bylo získáno pouze několik kusů tohoto druhu, proto nelze ze získaných výsledků vyvodit jednoznačné závěry.

V letech 2006 až 2011 nebyl zaznamenán zásadní rozdíl v počtu odchycených samců a samic. Největší záchyt *C. picta* byl v zimních měsících a koncem léta, kdy mera migruje z ovocných sadů na zimoviště.

5.1.4 Detekce *Candidatus Phytoplasma mali* v jedincích *Cacopsylla picta*

Detekce *Candidatus Phytoplasma mali* byla provedena u 141 jedinců *C. picta*. Očekávaný produkt o velikosti cca 1 200 bp, který odpovídal specifickému amplikonu fytoplazmové DNA, byl detekován u 28 jedinců (příklad vyhodnocení – viz Obr. 2). Amplifikace nebyla zaznamenána u negativní kontroly. Počet samců a samic pozitivních na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně je uveden v Tab. 15. Procento pozitivních samců a samic je uvedeno v Tab. 16.

Obr. 2: Detekce fytoplazmy proliferace jabloně ve vektoru *Cacopsylla picta*.



Legenda:

L: Standard molekulové hmotnosti (100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Canada).

1-12: Analyzovaní jedinci *C. picta* – jako pozitivní byl vyhodnocen vzorek s číslem 4, ostatní vzorky byly vyhodnoceny jako negativní.

C: Negativní kontrola.

Tab. 15: Počty pozitivních samců a samic *C. picta* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	0	0	3	3	-	-	-	-	-	-	3	3
únor	-	-	0	3	-	-	-	-	-	-	0	0	0	3
březen	-	-	-	0	0	3	-	-	-	-	0	0	0	3
duben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	0	4	-	0	-	-	-	-	-	-	0	4
červenec	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	0
srpen	-	-	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	1
září	-	-	0	0	1	5	-	-	-	-	-	-	1	5
říjen	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
prosinec	1	0	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	1
celkem	2	1	0	7	4	12	0	0	1	1	0	0	7	21

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus.

Tab. 16: Procento pozitivních samců a samic *C. picta* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		průměr	
	♂ ^a	♀ ^A	♂ ^b	♀ ^A	♂ ^a	♀	♂	♀	♂ ^a	♀ ^A	♂ ^b	♀	♂	♀
leden	-	-	0	0	50	100	-	-	-	-	-	-	25	50
únor	-	-	0	38	-	-	-	-	-	-	0	0	0	19
březen	-	-	-	0	0	50	-	-	-	-	0	0	0	17
duben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
červen	-	-	0	57	-	0	-	-	-	-	-	-	0	29
červenec	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
srpen	-	-	0	0	0	25	-	-	-	-	-	-	0	13
září	-	-	0	0	33	83	-	-	-	-	-	-	17	42
říjen	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	25	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	20
prosinec	14	0	-	-	-	-	-	-	25	13	-	-	20	6
průměr	20	10	0	14	21	43	-	-	25	13	0	0	10	19

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus; **a, b**: stejná písmena označují hodnoty, mezi nimiž není u samců statisticky průkazný rozdíl při $p = 0,95$; **A, B**: stejná písmena označují hodnoty, mezi nimiž není u samic statisticky průkazný rozdíl při $p = 0,95$; všechny hodnoty jsou uvedeny v procentech.

U samců byl zjištěn průkazně vyšší výskyt pozitivních jedinců v letech 2006, 2008 a 2010. U samic byl prokazatelně nejvyšší výskyt pozitivních jedinců v roce 2008. Procento odchycených pozitivních samců a samic bylo v průběhu sledovaného období variabilní. V letech 2006 a 2010 byl prokazatelně vyšší záchyt pozitivních samců než samic, nicméně v letech 2007 a 2008 byl prokazatelně vyšší záchyt pozitivních samic ($p = 0,95$) – viz Tab. 16.

Průměrné zastoupení pozitivních jedinců v průběhu sledovaných let bylo 20 %. Zastoupení pozitivních samců bylo 10 %. Navíc pozitivní samci byli detekováni pouze v lednu, září, listopadu a prosinci. Pozitivních samic bylo téměř dvojnásobek, konkrétně 19 %. Největší zastoupení pozitivních mer bylo detekováno v lednu, kdy množství pozitivních samců dosáhlo 25 % a u samic dokonce 50 %, ovšem jednalo se o výsledky z malých sběrů. Naopak žádný pozitivní jedinec nebyl detekován v dubnu a červenci.

5.1.5 Výskyt vektora *Cacopsylla melanoneura*

Pro studium bionomie vektora *Cacopsylla melanoneura* a fytoplazmy proliferace jabloně bylo použito 316 jedinců (142 samců a 174 samic) *C. melanoneura* odchycených na zimovišti v Olšanech. Počet samců a samic odchycených v jednotlivých měsících a letech je uveden v Tab. 17.

Tab. 17: Počty samců a samic *C. melanoneura* odchycených v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	0	0	58	55	-	-	-	-	-	-	58	55
únor	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	25	45	25	45
březen	3	2	0	0	1	1	-	-	-	-	12	12	16	15
duben	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
červenec	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
srpen	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
září	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
říjen	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
prosinec	0	0	-	-	-	-	-	-	43	59	-	-	43	59
celkem	3	2	0	0	59	56	0	0	43	59	37	57	142	174

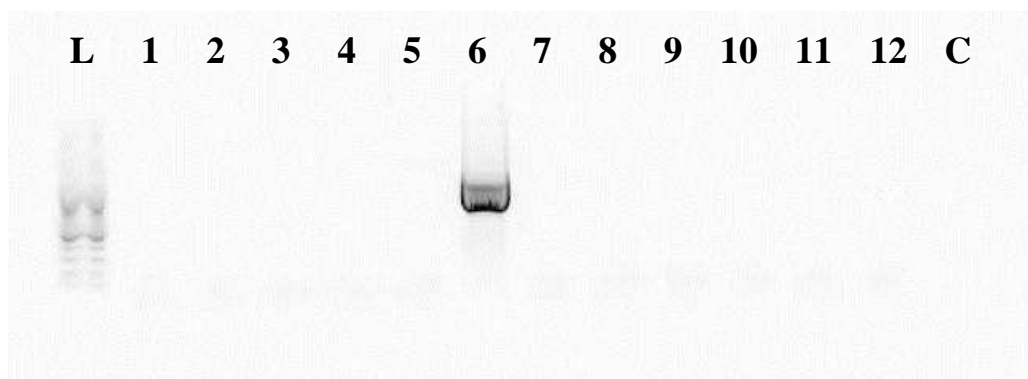
Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn.

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že *Cacopsylla melanoneura* byla, na rozdíl od *C. pruni* a *C. picta*, nejvíce aktivní v zimních měsících. Právě v tomto období byly její záchyty největší. Poměrně vysoký počet jedinců byl odchycen i na přelomu února a března, kdy mera migruje do ovocných sadů. Naopak žádní jedinci nebyli odchyceni v rozmezí měsíců dubna až listopadu. Počet odchycených samců a samic byl v letech 2006 až 2011 srovnatelný.

5.1.6 Detekce *Candidatus Phytoplasma mali* v jedincích *Cacopsylla melanoneura*

Detekce *Candidatus Phytoplasma mali* byla provedena u 316 jedinců *C. melanoneura*. Očekávaný produkt o velikosti cca 1 200 bp, který odpovídal specifickému amplikonu fytoplazmové DNA, byl detekován u 29 jedinců (příklad vyhodnocení – viz Obr. 3). Amplifikace nebyla zaznamenána u negativní kontroly. Počet samců a samic pozitivních na přítomnost fytoplazmy proliferace jabloně je uveden v Tab. 18. Procento pozitivních samců a samic uvedeno v Tab. 19.

Obr. 3: Detekce fytoplazmy proliferace jabloně ve vektoru *Cacopsylla melanoneura*.



Legenda:

L: Standard molekulové hmotnosti (100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Canada).

1-12: Analyzovaní jedinci *C. melanoneura* – jako pozitivní byl vyhodnocen vzorek s číslem 6, ostatní vzorky byly vyhodnoceny jako negativní.

C: Negativní kontrola.

Tab. 18: Počty pozitivních samců a samic *C. melanoneura* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		celkem	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	-	-	6	11	-	-	-	-	-	-	6	11
únor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	2	0
březen	1	1	-	-	0	1	-	-	-	-	1	1	2	3
duben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
červenec	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
srpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
září	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
říjen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
listopad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
prosinec	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	2	3
celkem	1	1	0	0	6	12	0	0	2	3	3	1	12	17

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus.

Tab. 19: Procento pozitivních samců a samic *C. melanoneura* v letech 2006 – 2011.

	2006		2007		2008		2009		2010		2011		průměr	
	♂ ^a	♀ ^A	♂	♀	♂	♀ ^B	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
leden	-	-	-	-	10	20	-	-	-	-	-	-	10	20
únor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	0	8	0
březen	33	50	-	-	0	100	-	-	-	-	8	8	14	53
duben	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
květen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
červen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
červenec	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
srpen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
září	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
říjen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
listopad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
prosinec	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	-	-	5	5
průměr	33	50	-	-	5	60	-	-	5	5	8	4	9	19

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; -: v daném období nebyl odchyt uskutečněn nebo nebyl odchyten žádný kus; **a**: označuje statisticky průkazný rozdíl u samců při $p = 0,95$; **A**, **B**: označuje statisticky průkazné rozdíly u samic při $p = 0,95$; všechny hodnoty jsou uvedeny v procentech.

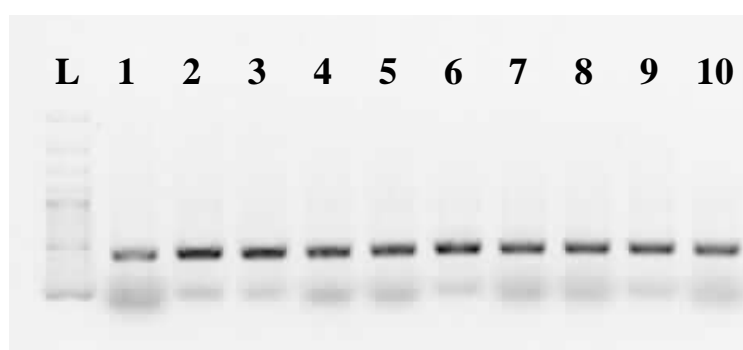
U samců byl zjištěn průkazně nejvyšší výskyt pozitivních jedinců v roce 2006. U samic byl prokazatelně nejvyšší výskyt pozitivních jedinců v roce 2008. Procento odchycených pozitivních samic bylo v letech 2006 a 2008 průkazně vyšší než procento odchycených pozitivních samců, nicméně v letech 2010 a 2011 byl výskyt pozitivních samců a samic srovnatelný ($p = 0,95$) – viz Tab. 19.

Průměrné zastoupení pozitivních jedinců v průběhu sledovaných let bylo 9 %. Zastoupení pozitivních samců bylo 9 %. Pozitivních samic bylo více než dvojnásobek, konkrétně 19 %. Největší výskyt pozitivních mer byl detekován v březnu, kdy množství pozitivních samců dosáhlo 14 % a u samic dokonce 53 %, ovšem jedná se o výsledek z malých sběrů.

5.2 Příprava standardu a kalibrační křivky pro kvantitativní PCR

Pro kvantifikaci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin ve vektoru *Cacopsylla pruni* byl připraven standard, kterým byl PCR produkt ECA1/ECA2. Pro přípravu standardu byla použita DNA pozitivního vzorku č. 3308. Klonovací plazmid nesoucí produkt ECA1/ECA2 byl pomocí teplotního šoku vložen do bakterií *E. coli*. Ze všech deseti testovaných bakteriálních kolonií byl PCR reakcí a následnou elektroforézou získán produkt o velikosti cca 490 bp (viz Obr. 4), což značilo správnost provedení transformace. Bylo tím rovněž potvrzeno, že DNA sekvence fytoplazmy byla vložena do plazmidu a tento segment má očekávanou velikost 237 bp.

Obr. 4: Ověření správnosti transformace bakterií na 1% agarózovém gelu.



Legenda:

L: Standard molekulové hmotnosti (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Canada).

1-10: Testované bakteriální kolonie.

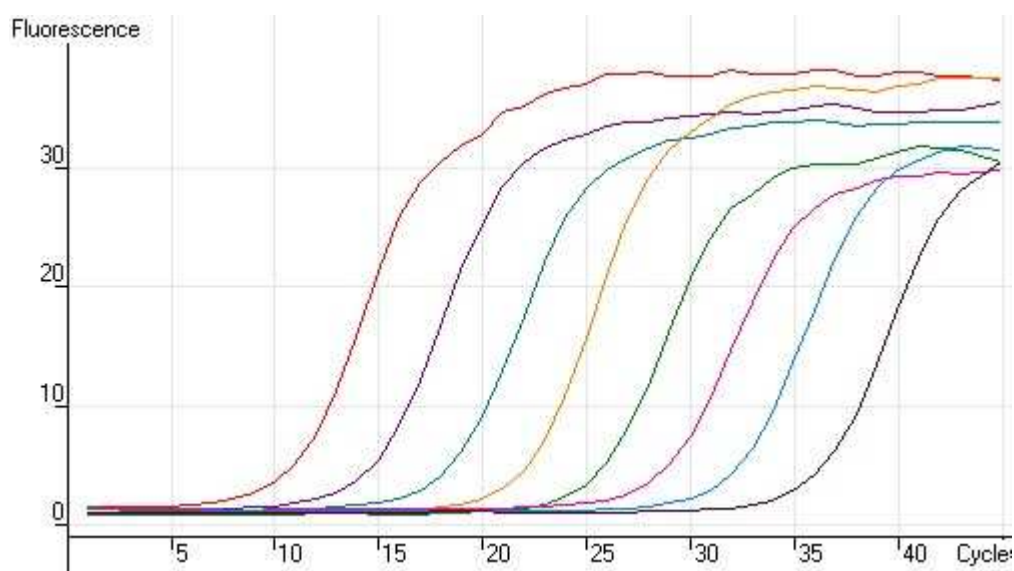
Na základě koncentrace plazmidu, který by izolován z transformovaných bakterií, byl vypočten počet kopií fragmentu ECA1/ECA2 v 1 μ l vzorku (viz Tab. 20).

Tab. 20: Naměřené hodnoty čistoty a koncentrace plazmidu a stanovený počet kopií fragmentu ECA1/ECA2.

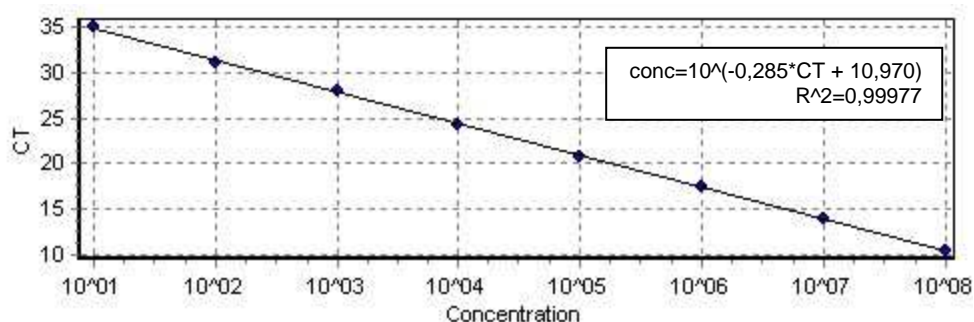
Čistota plazmidu (absorbance 260/280)	Koncentrace plazmidu [ng/ μ l]	Počet kopií fragmentu ECA1/ECA2 v 1 μ l vzorku
1,91	87,7	$2,51 \cdot 10^{10}$

Ředěním standardu ECA1/ECA2 byla vytvořena ředící řada v rozmezí 10^8 - 10^1 kopií v 1 μ l vzorku. Poté byla provedena real-time PCR s primery ECA1/ECA2, čímž byla získána kalibrační křivka pro kvantifikaci *Candidatus* Phytoplasma prunorum (viz Graf 2 a 3).

Graf 2: Detekce fluorescence kalibrační křivky v průběhu real-time PCR s primery ECA1/ECA2.



Graf 3: Kalibrační křivka pro primery ECA1/ECA2.



5.3 Kvantitativní stanovení fytoplazmy *Candidatus Phytoplasma prunorum* v *C. pruni*

Candidatus Phytoplasma prunorum byla kvantifikována v 71 jedincích (z toho 47 samců a 24 samic) *Cacopsylla pruni*, u kterých byla pomocí nested PCR v předchozích experimentech detekována fytoplazma. Absolutní kvantifikace byla provedena podle kalibrační křivky pomocí programu Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

Kvantifikace ESFY v jednotlivých kusech vektora byla provedena ve dvou opakováních, ze kterých byl vypočten průměrný počet kopií fytoplazmy v daném jedinci. Rozpětí koncentrace ESFY v samcích *C. pruni* nabývalo hodnot 1 až 6 538 156 kopií na jednoho jedince. U samic byl zjištěn počet kopií v rozpětí 1 až 4 092 739. Průměrný počet kopií ESFY v samcích nabýval hodnoty 593 445. U samic byl průměrný počet kopií nižší, a to 434 377. Kompletní výsledky kvantifikace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin jsou uvedeny v Tab. 21.

Z výsledků kvantifikace fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v jedincích *Cacopsylla* spp. vyplývá, že se fytoplazma ve vektoru vyskytuje buď v relativně nízkém počtu kopií (do 1 000 kopií na jedince) nebo naopak ve vysokém počtu kopií (nad 1 000 kopií na jedince). U 13 samců a 6 samic byl zjištěn obsah ESFY nad 1 000 kopií na jedince. Výskyt menšího počtu kopií ESFY v jedincích *C. pruni* byl častější – konkrétně u 34 samců a 18 samic.

Tab. 21: Výsledky kvantifikace *Candidatus Phytoplasma prunorum* v jedincích *C. pruni*.

datum sběru	pohlaví	počet kopií ESFY	datum sběru	pohlaví	počet kopií ESFY
27.1.2008	♀	1	10.2.2007	♂	10
9.3.2008	♀	1	31.3.2007	♂	12
27.9.2008	♀	2	25.11.2006	♂	12
18.3.2006	♀	6	29.8.2008	♂	13
27.9.2008	♀	7	26.7.2008	♂	13
22.9.2007	♀	8	10.2.2007	♂	14
27.9.2008	♀	9	29.8.2008	♂	16
10.2.2007	♀	10	27.9.2008	♂	16
29.8.2008	♀	19	26.7.2008	♂	17
10.2.2007	♀	21	25.2.2007	♂	17
29.3.2008	♀	23	10.2.2007	♂	17
29.3.2008	♀	29	22.9.2007	♂	19
27.9.2008	♀	30	22.9.2007	♂	24
26.7.2008	♀	41	25.2.2007	♂	29
25.11.2006	♀	59	29.8.2008	♂	30
26.7.2008	♀	86	29.3.2008	♂	31
25.11.2006	♀	227	25.2.2007	♂	40
25.11.2006	♀	618	26.7.2008	♂	40
24.6.2007	♀	2813	26.7.2008	♂	42
9.3.2008	♀	367092	29.3.2008	♂	47
22.9.2007	♀	857717	25.2.2007	♂	68
18.3.2006	♀	1572643	10.2.2007	♂	833
29.8.2008	♀	3530852	29.6.2007	♂	7894
29.3.2008	♀	4092739	27.9.2008	♂	132804
27.9.2008	♂	1	22.9.2007	♂	397759
9.3.2008	♂	3	26.7.2008	♂	804680
9.3.2008	♂	3	9.3.2008	♂	836710
9.3.2008	♂	4	22.9.2007	♂	931532
29.8.2008	♂	4	22.9.2007	♂	1876037
10.2.2007	♂	5	10.2.2007	♂	2049555
29.3.2008	♂	6	25.2.2007	♂	2246773
29.8.2008	♂	7	29.3.2008	♂	2660831
10.2.2007	♂	8	19.2.2011	♂	3415233
29.8.2008	♂	8	9.3.2008	♂	5992515
22.9.2007	♂	9	25.2.2007	♂	6538156
10.2.2007	♂	9			

Legenda: ♂: samec; ♀: samice; **zeleně** jsou označeni jedinci s obsahem fytoplazmy do 1 000 kopií; **žlutě** jsou označeni jedinci s obsahem fytoplazmy nad 1 000 kopií.

6 Diskuze

Cílem práce bylo rozšířit poznatky o molekulární epidemiologii fytoplazem *Candidatus Phytoplasma prunorum* a *Candidatus Phytoplasma mali* a bionomii jejich vektorů. Pro dosažení tohoto cíle jsem vypracovala literární rešerši na zadané téma a analyzovala vektory *Cacopsylla* spp. odchycené na zimovištích. V případě *Cacopsylla pruni* jsem navíc provedla i kvantifikaci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin. Výsledky této studie pomohou navrhnout opatření zamezující nebo omezující šíření těchto rostlinných patogenů v intenzivních výsadbách a tím omezit ekonomické ztráty, které způsobují.

Analyzovaní jedinci *Cacopsylla* spp. byli odchyťováni v letech 2006 – 2011 na zimovištích, kde přezimují ve stádiu imága a to obvykle na jehličnanech. Během sledovaných let byla nejhojněji se vyskytující merou *Cacopsylla pruni*, které bylo odchyceno 346 kusů. Výskyt *C. melanoneura* byl srovnatelný, konkrétně 316 kusů. Naopak nejméně se vyskytujícím druhem byla *C. picta* (odchyceno 141 kusů). Rozdílný výskyt *C. melanoneura* a *C. picta* popsali i Jarausch *et al.* (2007), kteří v rozmezí let 2002 až 2007 odchyťovali tyto dva druhy v Německu, severní Francii a severním Švýcarsku. V průběhu sledovaného období odchytili každý rok 150 až 1 500 kusů *C. melanoneura* a pouze 15 až 500 kusů *C. picta*.

Odchyt *Cacopsylla pruni* kulminoval v únoru a březnu, což je způsobeno zvýšením teplot a migrací mery do sadů. Dále bylo velké množství jedinců tohoto druhu odchyceno na přelomu srpna a září, kdy mera migruje zpět na zimoviště. Záchyt *C. picta* kulminoval v průběhu měsíce prosince až března. Tento dřívější odchyt pravděpodobně souvisí s dřívější migrací do sadů, kterou popsali Navrátil *et al.* (<http://www.lmbm.upol.cz>). *C. melanoneura* byla nejvíce aktivní v prosinci a lednu a její odchyt byl tedy největší právě v tomto období. Tato skutečnost může mít souvislost s tím, že se jedná o časově první z vektorů fytoplazem ovocných dřevin, u něhož dochází k reaktivaci po přezimování (Navrátil *et al.*, <http://www.lmbm.upol.cz>). Tedeschi *et al.* (2002) studovali v letech 1999 a 2000 dynamiku populace *C. melanoneura* v ovocných sadech. Uvedli, že v roce 1999 byl největší záchyt přezimující mery v první polovině března a na začátku dubna. V roce 2000 odchyt kulminoval v období od konce února do konce března. Je nutno podotknout,

že odchyt mer je silně ovlivněn klimatickými podmínkami. V případě vyšších teplot v zimních měsících jsou mery aktivnější, a proto je i jejich záchyt větší. Naopak při minusových teplotách je odchyt ztížený, protože mery zalézají do štěrbin v kůře jehličnanů, kde mnohdy zamrznou a není možno je odchytit.

V průběhu let 2006 až 2011 bylo na zimovišti v Olšanech detekováno 22 % pozitivních jedinců *Cacopsylla pruni*. Pozitivních samců i samic bylo přibližně stejné množství: 21 % samců a 23 % samic. Toto zimoviště se jeví jako důležitý rezervoár *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Podařilo se tak potvrdit, že v evropských zemích má fytoplasma evropské žloutenky peckovin velký epidemiologický význam (Carraro *et al.*, 1998; Jarausch *et al.*, 2001). Na zimovištích a v ovocných sadech na jižní Moravě sledovali množství pozitivních jedinců *C. pruni* i Fialová *et al.* (2007). Na zimovištích detekovali maximálně 13,3 % pozitivních jedinců, tedy méně než bylo detekováno v rámci této diplomové práce. V ovocných sadech se množství pozitivních pohybovalo do 33,3 %. Množství infikovaných jedinců *C. pruni* v ovocných sadech sledovali i Jarausch *et al.* (2007b). Zjistili, že fytoplasma evropské žloutenky peckovin obsahují 2 – 3 % odchycených mer. Potvrdili tak, že vektor *C. pruni* má pro šíření *Candidatus Phytoplasma prunorum* v Německu velký význam. Vyšší procento pozitivních mer, a to 8,6 %, popsali Carraro *et al.* (2004). Tedeschi *et al.* (2006) v jedné ze svých studií zjišťovali, zda se v sadech ve druhé polovině března vyskytují i ostatní vývojová stádia mery, která by obsahovala fytoplasma evropské žloutenky peckovin. Zjistili, že ano. ESFY detekovali ve vajíčcích (3 z 18 kusů), larvách (3 z 16 kusů) a dospělých jedincích nové generace (3 z 25 kusů). U přezimujících jedinců byla ESFY detekována v 18 ze 31 případů, což je 2,6x více než bylo detekováno při vypracování předložené práce.

V 71 jedincích *Cacopsylla pruni*, u kterých byla detekována fytoplasma *Candidatus Phytoplasma prunorum*, byla provedena absolutní kvantifikace této fytoplazmy. Aby bylo dosaženo co nejpřesnějších výsledků, byla kvantifikace každého vzorku provedena dvakrát a z těchto dvou získaných výsledků bylo vypočteno průměrné množství kopií fytoplazmy v daném jedinci. U samců *C. pruni* byla zjištěna koncentrace fytoplazmy v rozmezí 1 až 6 538 156 kopií, u samic v rozpětí 1 až 4 092 739 kopií. V obou případech se tedy jednalo o koncentrace řádově 10^1 až 10^6 kopií genomu fytoplazmy v každém jedinci. Kvantifikace tedy neukázala závislost obsahu fytoplazmy v jedinci na jeho pohlaví. Ovšem výsledky kvantifikace ESFY v *C. pruni* ukazují, že se fytoplasma ve vektoru vyskytuje

v relativně malém množství (tj. do 1 000 kopií na jedince) nebo naopak ve vysokém počtu opakování (tj. nad 1 000 kopií na jedince). Přičemž „nízkokopiových“ samců a samic (13 samců a 6 samic) bylo detekováno více než-li „vysokokopiových“ (34 samců a 18 samic). Nabízí se tedy otázka, zda jsou efektivním vektorem fytoplazmy evropské žloutenky peckovin pouze jedinci s obsahem fytoplazmy nad 1 000 kopií a zároveň jedinci s obsahem fytoplazmy do 1 000 kopií jsou pouhými hostiteli, nebo jsou efektivními vektory všichni jedinci *C. pruni*, u nichž byla ESFY detekována.

O kvantifikaci *Candidatus Phytoplasma prunorum* ve vektorech *C. pruni* je v současnosti pouze velmi málo údajů. Ovšem je možné, že podobná situace je i u jedinců *C. picta* a *C. melanoneura*, o kterých je známo více. *Martini et al.* (2007) navrhli postup pro kvantifikaci ESFY v hostitelích a jedincích *C. pruni* založený na real-time PCR s použitím primerů rpLNS2f/rpLNS2r2. Při aplikaci tohoto postupu stanovili množství fytoplazmy evropské žloutenky peckovin v merách v rozpětí $1,07 \cdot 10^7$ až $4,24 \cdot 10^7$ kopií. Dále se kvantifikací *Ca. P. prunorum* v hostitelích a vektorech zabývali *Jarausch et al.* (2010). Tito pro kvantifikaci fytoplazmy pomocí real-time PCR použili primery ECA1/ECA2. Pomocí tohoto páru primerů detekovali koncentraci ESFY ve vektorech řádově v rozmezí 10^6 až 10^8 kopií.

Další studie zabývající se kvantifikací mnou studovaných fytoplazem byly již zaměřeny na *Candidatus Phytoplasma mali*. *Jarausch et al.* (2007) v rámci studie hodnotící efektivitu vektorů *C. picta* a *C. melanoneura* využil kvantitativní PCR, pomocí níž stanovil obsah fytoplazmy proliferace jabloně v jedincích *C. picta* v množství 10^6 až 10^8 kopií na jednoho jedince. *Pedrazzoli et al.* (2007) sledovali nárůst koncentrace *Ca. P. mali* v jedincích *C. picta* a *C. melanoneura* po jejich řízeném odchovu na infikovaných jabloních. Výsledek studie ukázal, že nárůst koncentrace fytoplazmy je výraznější u prvního ze jmenovaných vektorů. *Thébaud et al.* (2008) sledovali, jak se změnila koncentrace fytoplazmy ve vektoru během jeho přezimování. Došli k závěru, že během přezimování dochází k namnožení fytoplazmy ve vektoru, a díky tomu je tento vektor po návratu do ovocných sadů schopen šířit fytoplazmu na nové hostitele. *Jarausch et al.* (2010) pomocí kvantitativní PCR sledovali účinnost akvizice a zmnožení fytoplazmy proliferace jabloně v jedincích *C. picta*, na základě čehož studovali interakci mezi AP a jejím vektorem.

V rámci této studie bylo detekováno 20 % pozitivních jedinců *Cacopsylla picta*, respektive 10 % pozitivních samců a 19 % pozitivních samic. Takto rozdílné množství pozitivních samců a samic nebylo doposud popsáno. Nicméně jedinců této mery bylo odchyceno poměrně malé množství (celkem 141), takže z výsledků nelze vyvodit jednoznačné závěry. V rozmezí let 2002 až 2007 Jarausch *et al.* (2007a) sledovali, která mera má větší uplatnění v přenosu *Candidatus* Phytoplasma mali v Německu, severní Francii a severním Švýcarsku. Zjistili, že se v přenosu fytoplazmy ve studovaných lokalitách pravděpodobně uplatňuje jen *C. picta*, u níž bylo detekováno 10 % pozitivních jedinců, což značí poloviční výskyt pozitivních jedinců oproti zimovištím v Olšanech a Bukovině. Pozitivních *C. melanoneura* byly detekovány pouze 2 kusy z několika set odchycených. Ke srovnatelným výsledkům dospěli i Baric *et al.* (2010), kteří se zabývali studiem molekulární epidemiologie fytoplazmy proliferace jabloně v ovocných sadech v jižním Tyrolsku. Pomocí real-time PCR detekovali fytoplazmu proliferace jabloně u 11,1 % jedinců této mery. Studovanou fytoplazmu rovněž detekovali u 0,6 % jedinců *C. melanoneura*.

Podařilo se potvrdit, že potenciálním vektorem *Candidatus* Phytoplasma mali s velkým epidemiologickým významem je v České republice i *Cacopsylla melanoneura*. Zastoupení pozitivních jedinců na zimovištích v průběhu sledovaných let dosáhlo 9 %, přičemž množství pozitivních samců bylo rovněž 9 % a pozitivních samic více než dvojnásobek – konkrétně 19 %. Rovněž výsledky studií v severní Itálii ukazují, že i zde je *C. melanoneura* významným činitelem v šíření fytoplazmy proliferace jabloně. Dokonce se uvažuje, že se v této lokalitě jedná o hlavního vektora AP. A to i přes to, že výskyt pozitivních jedinců *C. melanoneura* zde byl nižší než na zimovišti v Olšanech, konkrétně 3 až 4 % z celkového množství odchycených kusů (Tedeschi *et al.* 2004). Naopak pokusy v Německu (Mayer *et al.* 2009) a jižním Tyrolsku (Wolf *et al.* 2003) ukázaly, že *C. melanoneura* nemůže infikovat zdravé rostliny a tudíž zde nemá jako vektor význam. Tyto velké rozdíly výsledků jednotlivých studií mohou být způsobeny existencí různých populací *C. melanoneura*, které se liší ve schopnosti infikovat se fytoplazmou proliferace jabloně a přenést ji na nové hostitele (Mayer *et al.* 2009). Na druhou stranu bylo zjištěno, že *Candidatus* Phytoplasma mali je geneticky velmi variabilní (Schneider *et al.* Seemüller, 2009), a proto se dá předpokládat, že některé kmeny mohou být přenášeny pomocí *C. melanoneura* a některé pomocí *C. picta*. Nicméně tuto hypotézu je nutno ověřit studiem

izolátů *Ca. P. mali* z různých geografických lokalit a populací vektorů. Tedeschi *et* Alma (2004) studovali účinnost přenosu fytoplazmy proliferace jabloně jednotlivými vývojovými stádii *C. melanoneura*. Ke studiu využili metodu detekce fytoplazmy pomocí nested PCR a zároveň namátkově pomocí PCR-RFLP analýzy ověřovali přítomnost *Ca. P. mali*. Došli k závěru, že větší roli v šíření této fytoplazmy v ovocných sadech mají přezimující dospělci než-li larvy a dospělci nové generace.

Jako další postup pro objasňování molekulární epidemiologie fytoplazem evropské žloutenky peckovin a proliferace jabloně a bionomie jejich vektorů navrhuji analyzovat situaci v ovocných sadech. Konkrétně je třeba zjistit, jak se změní koncentrace fytoplazem ve vektorech po období přezimování. Zda se fytoplazma namnoží a jaké to bude mít na její další šíření dopady. Tuto studii nebylo možno obsáhnout v rámci jedné diplomové práce, protože se jedná o časově náročné experimenty, při kterých je každý jednotlivý jedinec vektora zpracováván zvlášť.

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem vypracovala literární rešerši na téma molekulární epidemiologie *Candidatus* Phytoplasma pruni a *Candidatus* Phytoplasma mali. V experimentální části jsem se zabývala detekcí fytoplazem *Candidatus* Phytoplasma pruni a *Candidatus* Phytoplasma mali pomocí nested PCR. U vektora *C. pruni* jsem navíc stanovila koncentraci fytoplazmy evropské žloutenky peckovin pomocí kvantitativní PCR.

Pro detekci fytoplazem ve vektorech jsem použila vysoce citlivou metodu nested PCR s využitím primerů P1/P7 a R16F2/R16R2. Výsledky této analýzy ukázaly, že se studované fytoplazmy vyskytovaly u vysokého počtu jedinců. U *Cacopsylla pruni* jsem detekovala 22 % pozitivních jedinců, u vektora *C. picta* 20 % jedinců a u *C. melanoneura* 9 % jedinců. Potvrdila jsem tak, že tyto druhy mají v České republice značný epidemiologický význam.

U jedinců *Cacopsylla pruni*, ve kterých byla fytoplazma detekována, jsem rovněž provedla kvantifikaci. *Candidatus* Phytoplasma prunorum se v tomto vektoru vyskytovala v množství 10^1 až 10^6 kopií na jednoho jedince, přičemž se v něm vyskytovala v relativně malém množství (do 1 000 kopií) nebo naopak velkém množství (nad 1 000 kopií). Zároveň provedená kvantifikace neukázala závislost obsahu fytoplazmy v jedinci na jeho pohlaví.

8 Seznam použitých zkratk

AP	fytoplazma proliferace jabloně (Apple proliferation)
bp	pár bází (base pair)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	deoxyribonukleozidtrifosfáty
ESFY	fytoplazma evropské žloutenky peckovin (European stone fruit yellows phytoplasma)
kb	1 000 bází
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
rpm	počet otáček za minutu

9 Literatura

- Bai, X., Zhang, J., Holford, I.R., Hogenhout, S.A. (2004): Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. *FEMS Microbiology Letters* 235: 249–258.
- Baric, S., Berger, J., Cainelli, C., Kerschbamer, C., Letschka, T., Dalla Via, J. (2011): Seasonal colonization of apple trees by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. *European Journal of Plant Pathology* 129: 455-467.
- Baric, S., Dalla-Via, J. (2004): A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* 57: 135-145.
- Baric, S., Öttl, S., Dalla Via, J. (2010): Infection rates of natural psyllid populations with ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in South Tyrol (Northern Italy). *Julius-Kühn-Archiv* 427: 189-192.
- Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A., Nault, L.R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 271-276.
- Berges, R., Rott, M., Seemüller, E. (2000): Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 10: 1145-1152.
- Blattný, C. jr. (1977): Syndrome of apricot witches’ broom. *Biologia Plantarum* 19: 313-315.
- Blattný, C., Váňa, V. (1974): Pear decline accompanied with mycoplasmalike organisms in Czechoslovakia. *Biologia Plantarum* 16: 474-475.
- Brčák, J., Králík, O., Seidl, V. (1972): Mycoplasmas in apple trees infected with the proliferation disease. *Biologia Plantarum* 14: 427–429.
- Burckhardt, D. (1994): Psyllid pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea): a review. *Entomology (Trends in Agricultural Science)* 2: 173–186.
- Burckhardt, D., Jarausch, B., Jarausch, W. (2008): www.psyllidkey.info: ein elektronischer Schlüssel zur Bestimmung der Psylliden auf Rosaceen in Mitteleuropa. *Mitteilungen aus dem Julius-Kühn-Institut* 417: 177.
- Carraro, L., Ferrini, F., Labonne, G., Ermacora, P., Loi, N. (2008): Infectivity of *Cacopsylla picta* (syn. *Cacopsylla costalis*), vector of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in north east Italy. *Acta Horticulturae* 781: 403–407.
- Carraro, L., Ferrini, F., Labonne, G., Ermacora, P., Nazia, L. (2004): Seasonal infectivity of *Cacopsylla pruni*, vector of European stone fruit yellows phytoplasma. *Annals of Applied Biology* 144: 191-195.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 695-700.
- Čermák, V., Lauterer, P. (2007): Overwintering of psyllids (Hemiptera, Psylloidea) in South Moravia (Czech Republic) with respect to the vectors of the apple proliferation cluster phytoplasmas. 4th European Hemiptera Congress, Ivrea, Italy, 10–14 September 2007.

- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 33: 259-266.
- EPPO/CABI (1996a): Apple proliferation phytoplasma. In: *Quarantine pests for Europe*. 2nd edition (Ed. by Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M.). CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK
- EPPO/CABI (1996b): Apricot chlorotic leafroll phytoplasma. In: *Quarantine pests for Europe*. 2nd edition (Ed. by Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M.). CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK
- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Navrkalová, V. (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). *Bulletin of Insectology* 60: 183-184.
- Foerster, A. (1848): Uebersicht der Gattungen und Arten in der Familie der Psylloiden. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande* 5: 65-98.
- Gross, J., Mekonen, N. (2005) Plant odours influence the host finding behaviour of apple psyllids (*Cacopsylla picta*; *C. melanoneura*). *IOBC WPRS Bulletin* 28: 351-355.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.
- Gundersen, D.E., Lee, I.-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176: 5244-5254.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Dickinson, M. (2009): Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2945-2950.
- Hodkinson, I.D. (1974): The biology of the Psylloidea (Homoptera): a review. *Bulletin of Entomological Research* 64: 325-339.
- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A. (2004): Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17: 1175-1184.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group (2004): 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Jarausch, B., Fuchs, A., König, D., Krczal, G., Jarausch, W. (2010a): Analysis of the acquisition and multiplication efficiency of different strains of *Ca. Phytoplasma mali* by the vector *Cacopsylla picta*. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 175-177.
- Jarausch, B., Fuchs, A., Mühlentz, I., Lampe, I., Harzer, U., Jarausch, W. (2007b): Research on European stone fruit yellows (ESFY) in Germany. *Bulletin of Insectology* 60: 389-390.
- Jarausch, B., Fuchs, A., Schwind, N., Krczal, G., Jarausch, W. (2007a): *Cacopsylla picta* as most important vector for 'Candidatus Phytoplasma mali' in Germany and neighbouring regions. *Bulletin of Insectology* 60: 189-190.

- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Seemuller, E., Dickler E. (2003) First report of *Cacopsylla picta* as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Disease* 87: 101.
- Jarausch, W., Fuchs, A., Jarausch, B. (2010b): Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the specific quantification of *Ca. Phytoplasma prunorum* in plants and insects. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 392-394.
- Jarausch, W., Jarausch-Wehrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C., Garnier, M. (2001): Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology* 107: 209-217.
- Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F. (1999): Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *Journal of Phytopathology* 147: 47-54.
- Jarausch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J. M., Dosba, F. (1998): PCR Assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology* 104: 17–27.
- Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., Krczal, G. (2004): Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657: 415-419.
- Jarausch, W., Saillard, C., Broquaire, J.M., Garnier, M., Dosba, F. (2000): PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Molecular and Cellular Probes* 14: 171-179.
- Kaminska, M., and Sliwa, H. (2008): Mixed infection of dahlia plants in Poland with apple proliferation and aster yellows phytoplasmas. *Plant Pathology* 57: 363.
- Lauterer, P. (1999): Results of investigations on Hemiptera in Moravia, made by Moravian Museum (Psylloidea 2). *Acta Musei Moraviae, Scientae Biologicae (Brno)* 84, 71–151.
- Lee, I.-M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen, D.E. (1995): Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728-735.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen, D.E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Loi, N., Carraro, L., Mussetti, R., Ferraro, G., Osler, R. (1995): Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. *Journal of Phytopathology* 143: 581-584.
- Makarova, O., MacLean, A. M., Hogenhout, S. A., Nicolaisen, M. (2011): Use of quantitative real-time PCR for a genome-wide study of AYWB phytoplasma gene expression in plant and insect hosts. *Bulletin of Insectology* 64: S23-S24.
- Marcone, C., Gibb, K.S., Streten, C., Schneider, B. (2004): ‘Candidatus *Phytoplasma spartii*’, ‘Candidatus *Phytoplasma rhamni*’ and ‘Candidatus *Phytoplasma allocasuarinae*’, respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1025-1029.

- Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999): Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- Martini, M., Ermacora, P., Magris, G., Ferrini, F., Loi, N. (2011): Symptom expression and 'Candidatus Phytoplasma prunorum' concentration in different *Prunus* species. *Bulletin of Insectology* 64: S171-S172.
- Martini, M., Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Pastore, M. (2007): A real-time PCR Method for detection and quantification of „Candidatus Phytoplasma prunorum“ in its natural hosts. *Bulletin of Insectology* 60: 251-252.
- Mattedi, L., Forno, F., Cainelli, C., Grando, M.S., Jarausch, W. (2008): Research on *Candidatus Phytoplasma mali* transmission by insect vectors in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 369–374.
- Mayer, C.J., Gross, J. (2007): Different host plant odours influence migration behaviour of *Cacopsylla melanoneura* (Forster), an insect vector of the apple proliferation phytoplasma. *IOBC WPRS Bulletin* 30: 177–184.
- Mayer, C.J., Jarausch, B., Jarausch, W., Jelkmann, W., Vilcinskis, A., Gross, J. (2009): *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. *Phytopathology* 99: 729–738.
- Mayer, C.J., Vilcinskis, A., Gross, J. (2008): Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behaviour. *Journal of Chemical Ecology* 34: 1518–1522
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J. & 16 other authors (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: *The Mycoplasmas*, vol. 5. Academic Press, New York, 545–640.
- Mehle, N., Brzin, J., Boben, J., Hren, M., Frank, J., Petrovic, N., Gruden, K., Dreo, T., Zezlina, I., Seljak, G., Ravnikar, M. (2006): First report of 'Candidatus Phytoplasma mali' in *Prunus avium*, *P. armeniaca*, and *P. domestica*. *New Disease Reports* 14: 42.
- Murrall, D.J., Nault, L.R., Hoy, C.W., Madlen, L.V., Miller, S.A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 89: 1223-1232.
- Nečas T., Mašková V., Krška B. (2008): The possibility of ESFY phytoplasma transmission: through flowers and seeds. *Acta Horticulturae* 781: 443-447.
- Németh, M. (1986): Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. *Akadémiai Kiado, Budapest*, 626-633.
- Oberhänsli, T., Altenbach, D., Bitterlin, W. (2011): Development of a duplex TaqMan real-time PCR for the general detection of phytoplasmas and 18S rRNA host genes in fruit trees and other plants. *Bulletin of Insectology* 64: S37-S38.
- Pedrazzoli, Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Salvadori, A., and Zorer, R. (2008): Seasonal colonization behavior of *Candidatus Phytoplasma mali* in apple trees in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 483-488.
- Pedrazzoli, F., Gualandri, V., Forno, F., Mattedi, L., Malagnini, V., Salvadori, A., Stoppa, G., Ioriatti, C. (2007): Acquisition capacities of the overwintering adults of the psyllid vectors of 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Bulletin of Insectology* 60: 195-196.
- Pignatta, D., Poggi Pollini, C., Giunchedi, L., Ratti, C., Reggiani, N., Forno, F., Mattedi, L., Gobber, M., Miorelli, P., Ropelato, E., (2008): A real-time PCR assay for the detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) in plant propagation material. *Acta Horticulturae* 781: 499-504.

- Seemüller, E. (1990): Apple proliferation. In: A.L. Jones and H.S. Aldwinckle (eds.) Compendium of Apple and Pear Diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp. 67-68.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.
- Seemüller, E., Schaper, U., Zimbelmann, F. (1984): Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Journal of Plant Disease and Protection)* 91: 371-382.
- Seemüller, E., Schneider, B. (2004): 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.
- Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 440-446.
- Seemüller, E., Stolz, H., Kison, H. (1998): Persistence of the European stone fruit yellows phytoplasma in aerial parts of *Prunus* taxa during the dormant season. *Journal of Phytopathology* 146: 407-410.
- Seidl, V., Komarkova, V. (1974): Studies on the natural spread of proliferation disease of apple. *Phytopathologische Zeitschrift* 81: 301-313.
- Schaper, U., Seemüller, E. (1982): Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72: 736-742.
- Schneider, B., Seemüller, E. (2009): Strain differentiation of *Candidatus Phytoplasma mali* by SSCP and sequence analyses of the *hflB* gene. *Journal of Plant Pathology* 91: 103-112.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. I: 369-380. Academic Press, San Diego, USA.
- Tedeschi, R., Alma, A. (2004): Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 91: 8-13.
- Tedeschi, R., Alma, A. (2006) *Fieberiella fl orii* (Stal) (Homoptera Auchenorrhynca) as a vector of 'Candidatus Phytoplasma mali'. *Plant Disease* 90: 284-290.
- Tedeschi, R., Bosco, D., Alma, A. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95: 544-551.
- Tedeschi, R., Ferrato, V., Rossi, J., Alma, A. (2006): Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55: 18-24.
- Tedeschi, R., Lauterer, P., Brusetti, L., Tota, F., Alma, A. (2009): Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European Journal of Plant Pathology* 123: 301-310.

- Tedeschi, R., Visentin, C., Alma, A., Bosco, D. (2003): Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 142: 285-290.
- Thébaud, G., Yvon, M., Alary, R., Sauvion, N., Labonne, G. (2009): Efficient transmission of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. *Phytopathology* 99: 265–273.
- Thébaud, G., Yvon, M., Labonne, G. (2008): European stone fruit yellows: consequences of the life cycle of the vector and of the multiplication of the phytoplasma in the insect on the epidemiology of the disease. *Acta Horticulturae* 781: 423-428.
- Torres, E., Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., Martín, M.P. (2005): Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19: 334–340.
- Torres, E., Lavina, A., Sabaté, J., Bech, J., Batlle, A. (2010): Evaluation of susceptibility of pear and plum varieties and rootstocks to *Ca. P. pyri* and *Ca. P. prunorum* using real-time PCR. *Julius-Kühn-Archiv* 427: 395-398.
- Tsai, J.H. (1979): Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: Whitcomb, R.F. and Tully, J.D. (eds) *The Mycoplasmas*. Vol III, 265–307; Academic Press, New York
- Wolf, M., Zelger, R., Baric, S. (2003): Die Rolle des Weißdornblattsaugers bei der Übertragung der Apfeltriebsucht in Südtirol. *Obstbau Weinbau* 40: 315-317.
- Yvon, M., Thébaud, G., Alary, R., Labonne, G. (2009): Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent 'Candidatus Phytoplasma prunorum'. *Molecular and Cellular Probes* 23: 227-234.

10 Příloha

22nd 'International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops' (ICVF), ROME, ITALY – 3-8 JUNE 2012

MONITORING OF FRUIT TREE PHYTOPLASMA VECTORS IN OVERWINTERING SITE

M. Navrátil, M. Horníková, P. Lauterer, V. Čermák, M. Starý, P. Válová, D. Šafářová

Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

Corresponding author: Milan Navrátil (milan.navratil@upol.cz)

Psyllids – vectors of fruit tree phytoplasmas – were studied in overwintering site, locality Olšany (south Moravia, Czech Republic) over the years 2006-2010. The population dynamics of *Cacopsylla pruni* (*Candidatus* Phytoplasma prunorum vector), *C. picta* and *C. melanoneura* (both *Candidatus* phytoplasma mali vectors) was monitored as well as incidence of phytoplasma positive individuals was pursued by PCR/RFLP analysis. Using a sweeping net on a long stick total 803 individuals of above mentioned vectors were collected. It was confirmed that conifers (*Picea abies* as the dominant species in the area) growing in the investigated highland site of middle Moravia harbour *C. pruni*, *C. picta* and *C. melanoneura* during the winter season. It was enlarged knowledge about seasonal migration of three studied psyllid species. Sum of captured individuals varied from year to year depending on population density, seasonal migration of psyllids and their activity, and weather. *C. picta* was less frequently captured of three phytoplasma vectors studied. The presence of the phytoplasma positive individuals reached 22% for *C. pruni* (*Candidatus* Phytoplasma prunorum), 15% for *C. picta*, and 14% for *C. melanoneura* (both *Candidatus* phytoplasma mali).

The work was supported by the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (grant No. OC10034) and Ministry of Agriculture (grant No. QJ1210209).