

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Eliška Kolonderová

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**'*Candidatus Phytoplasma prunorum*' - významný
patogen meruněk a její vektorů**

Bakalářská práce

Eliška Kolonderová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Eliška KOLONDEROVÁ
Osobní číslo: R19836
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: 'Candidatus Phytoplasma prunorum' - významný patogen meruněk a její vektorů
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Literární rešerše zaměřená na biologickou a molekulárně genetickou charakteristiku fytoplazmy 'Ca. Phytoplasma prunorum' (ESFY), významného patogena meruněk, a jejích vektorů, zejména mery *Cacopsylla pruni*.

Molekulární detekce a genotypizace zástupců r. *Cacopsylla pruni* za použití DNA markerů, pomocí metody PCR a sekvenování, bioinformatická analýza získaných sekvenčních dat.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Bertin S., Bosco D. (2013) Molecular identification of phytoplasma vector species.

Peccoud J., Labonne G., Sauvion N. (2013) Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex.

Marcone, Carmine & Jarausch, Barbara & Jarausch, W.. (2010). *Candidatus Phytoplasma prunorum*, the causal agent of European stone fruit yellows: An overview.

Necas, Tomas & Ondrášek, I. & Krška, Boris. (2015). *Candidatus Phytoplasma prunorum*; -a pathogen spreading uncontrollably in apricot orchards in the Czech Republic.

Jean Luc Danet et al. (2011) Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination *Microbiology*.

Erich Seemüller, Bernd Schneider *Candidatus Phytoplasma mali*; *Candidatus Phytoplasma pyri*; and *Candidatus Phytoplasma prunorum*; the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 6. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc - Holiče
tel.: +420 585 634 90

L.S.

- 7 - 04 - 2021

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autora:** Eliška Kolonderová**Název práce:** 'Candidatus Phytoplasma prunorum' - významný patogen meruněk a její vektorů**Typ práce:** bakalářská**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci**Vedoucí práce:** Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**Rok obhajoby práce:** 2022**Klíčová slova:** 'Candidatus Phytoplasma prunorum', fytoplazma evropské žloutenky peckovin, *Cacopsylla pruni*, mera tmková, COI, COII**Počet stran:** 57**Počet příloh:** 0**Jazyk:** český**Abstrakt**

'Candidatus Phytoplasma prunorum' je patogen dřevin rodu *Prunus*, u kterých způsobuje onemocnění zvané evropská žloutenka peckovin. Toto onemocnění je především rozšířeno ve střední a jižní Evropě. Tato bakalářská práce byla zaměřena na molekulární detekci a genotypizaci jedinců vektorové mery, *Cacopsylla pruni*, kteří byli odchyceni v různých letech na šesti lokalitách na jižní Moravě. Bylo získáno 40 parciálních sekvencí COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA. Porovnáním těchto sekvencí se sekvencemi *COI* a *COII* dostupnými v databázi GenBank vykazovala většina sekvencí nejvyšší identitu 99–100 % se *COI* sekvencemi jedinců *C. pruni*, gt02 a gt03 (Acc. No. KM206191.1, KM206192.1) původem z Itálie. U 7 vzorků série 141 původem z lokality Kalčnick byly získány sekvence vykazující 88–90% identitu se *COI* sekvencemi *C. melanoneura*. Jedinci série 141 byli s největší pravděpodobností chybně identifikováni jako *C. pruni*, ale přísluší k *C. melanoneura*. Na základě 16S rDNA genotypizace byli všichni jedinci *C. pruni* zařazeni do potenciálního kryptického druhu *C. pruni* B, genotyp B. Fylogenetická analýza parciálních sekvencí *COI* a *COII* tato zjištění potvrdila. Získané sekvence se vyvětvily do dvou samostatných skupin. Většina z nich se vyvětvila společně se *COI* sekvencemi *C. pruni* získanými z databáze GenBank. Analýza potvrdila identitu jedinců série 141, získané sekvence se vyvětvily společně se *COI* sekvencemi *C. melanoneura* získanými z databáze GenBank. V případě *COII* oblasti byla pozorována obdobná topologie fylogenetického stromu.

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Eliška Kolonderová**Title:** 'Candidatus Phytoplasma prunorum' - important pathogen of apricot trees and its vectors**Type of thesis:** bachelor**Department:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký University Olomouc**Supervisor:** Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**The year of presentation:** 2022**Keywords:** 'Candidatus Phytoplasma prunorum', European stone fruit yellows phytoplasma, *Cacopsylla pruni*, COI, COII**Number of pages:** 57**Number of appendices:** 0**Language:** Czech**Abstract**

'Candidatus Phytoplasma prunorum' is a pathogen of the genus *Prunus*, which causes a disease commonly called European stone fruit yellows. This disease is mostly spread in Central and Southern Europe. This bachelor thesis was focused on molecular detection and genotyping of samples of vector *Cacopsylla pruni*, which have been captured during the period of several years in six different locations of South Moravia. I have obtained 40 partial sequences COI-tRNA^{Leu}-COII of mitochondrial DNA. By comparison of these sequences with sequences *COI* and *COII* available in the GenBank database, the majority of the sequences had the highest identity match of 99–100 % with *COI* sequences of *C. pruni*, gt02 and gt03 (Acc. No. KM206191.1, KM206192.1) originated from Italy. Seven samples of series 141 from the location Kalečník had sequences showing 88–90 % identity match with *COI* sequences of *C. melanoneura*. The samples from series 141 have been most likely misidentified as belonging to *C. pruni* species, even though they probably do belong to *C. melanoneura* species. Based on 16S rDNA genotyping have been all samples of *C. pruni* species classified into cryptic species *C. pruni* B, genotype B. Phylogenetic analysis of partial sequences *COI* and *COII* these findings confirmed. Obtained sequences have branched into two individual groups. The majority have branched together with *COI* sequences of *C. pruni* obtained from GenBank database. The analysis have confirmed the identity of the samples of 141 series, the obtained sequences have branched together with *COI* sequences of *C. melanoneura* - also obtained from GenBank database. In case of *COII* parts, there have been found corresponding topology of phylogenetic tree.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci dne

.....
Kolonderová Eliška

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost, cenné a odborné rady při práci v laboratoři a za její čas, který mi věnovala po celou dobu zpracování této práce.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Charakteristika fytoplazem	3
3.2 Objev fytoplazem a jejich klasifikace	4
3.3 Genom fytoplazem	6
3.4 ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum'	7
3.5 Mera trnková (<i>Cacopsylla pruni</i>)	10
3.6 Interakce hostitelské rostliny a fytoplazmy	13
3.7 Interakce vektoru a fytoplazmy	13
3.7.1 Období akvizičního sání	14
3.7.2 Období latence	14
3.7.3 Období inokulace	15
3.8 Ekonomický význam ESFY a jeho kontrola	16
3.9 Metody detekce a identifikace fytoplazem	16
4 MATERIÁL A METODY	19
4.1 Biologický materiál	19
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
4.3 Použité přístroje a zařízení	20
4.4 Použité metody	21
4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
4.4.2 Elektroforetická separace	25
4.4.3 Purifikace PCR produktů	26
4.4.4 Sekvenační značení	27
4.4.5 Bioinformatická analýza	28
5 VÝSLEDKY	29
5.1 Amplifikace COI-tRNA ^{Leu} -COII oblasti mitochondriální DNA	29
5.2 Analýza genetické variability COI genu a fylogenetická analýza	31
5.3 Genotypizace jedinců pomocí vnitřního transkribovaného mezerníku (ITS2)	40
6 DISKUSE	44
7 ZÁVĚR	47
8 LITERATURA	48

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Příznaky onemocnění ESFY, svinutka listů, na meruňce (D. Šafářová).
- Obrázek 2:** Životní stádia mery trnkové (*Cacopsylla pruni*) (Bertaccini *et al.*, 2019a).
- Obrázek 3:** Životní cyklus fytoplazem (Bertaccini *et al.*, 2019a).
- Obrázek 4:** Oblast nasedání pramerů UEA9, UEA9mod, C2-N-3389 a C1-J1709 (podle Simon *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2011).
- Obrázek 5:** Produkty PCR amplifikace COI–tRNA^{Leu}–COII oblasti mitochondriální DNA s použitím pramerů C2–N–3389/ C1–J1709 a MyFi™ DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.
- Obrázek 6:** Produkty PCR amplifikace COI–tRNA^{Leu}–COII oblasti mitochondriální DNA s použitím pramerů C2–N–3389/UEA9 (A) a C2–N–3389/UEA9mod (B) a MyTaq™ Red DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.
- Obrázek 7:** Produkty PCR amplifikace COI–tRNA^{Leu}–COII oblasti mitochondriální DNA s použitím pramerů C2–N–3389/C1–J1709 a MyFi™ DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.
- Obrázek 8:** P-distance analýza identity parciálních sekvencí COI genu u studovaných zástupců rodu *Cacopsylla*.
- Obrázek 9:** Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla pruni* a dalších zástupců mer a mer vyskytujících se v ČR zkonstruovaný na základě Neighbor-Joining analýzy parciální sekvence COI genu v pozici 9–404 bp sekvence 130/1.
- Obrázek 10:** P-distance analýzy identity parciálních sekvencí COII genu u zástupců rodu *Cacopsylla*.
- Obrázek 11:** Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla pruni* a dalších zástupců mer a mer vyskytujících se v ČR zkonstruovaný na základě Neighbor-Joining analýzy parciální sekvence COII genu v pozici 989–1 612 bp sekvence 130/1.
- Obrázek 12:** Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp480R/CpA300F/CpB120F.
- Obrázek 13:** Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp480R/CpA50F/CpB350F.
- Obrázek 14:** Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp135F/CpA424R/Cp315R.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní informace o odchytech jedinců druhu *Cacopsylla pruni*.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi při použití MyFi™ Mix.

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi při použití MyTaq™ Red DNA polymerázy.

Tabulka 5: Podmínky PCR amplifikace.

Tabulka 6: Seznam primerů použitých pro genotypizaci mery trnkové.

Tabulka 7: Složení PCR reakční směsi.

Tabulka 8: Podmínky PCR amplifikace.

Tabulka 9: Seznam primerů použitých pro sekvenační značení.

Tabulka 10: Podmínky sekvenační PCR amplifikace.

1 ÚVOD

Fytoplazmy patří mezi významné patogeny rostlin, bylin i dřevin, které každoročně na celém světě způsobují závažná onemocnění rostlin, která vedou k výraznému poklesu ve kvalitě a výnosu plodů, a tím negativně ovlivňují hospodářskou produkci. Významnou chorobou dřevin rodu *Prunus* je evropská žloutenka peckovin (ESFY, european stone fruit yellows), která je způsobena fytoplazmou evropské žloutenky peckovin ('*Candidatus* Phytoplasma prunorum'). Nejcitlivěji na tuto chorobu reagují meruňka obecná, broskvoň obecná či slivoň japonská, u které byla choroba poprvé identifikována. Infikované dřeviny rodu *Prunus* vykazují obvykle příznaky, které se ale nemusí vždy projevit. Mezi typické symptomy řadíme chlorotické svinutí listů, leptonekrózu, žloutnutí až červenání listů, případně jejich předčasný opad. Přenos je nejčastěji způsoben vektory, zástupci druhu *Cacopsylla pruni*. Identifikace vektorových mer na základě morfologických vlastností je velmi náročná, a proto je potřeba vyvíjet molekulární metody detekce, jako je například metoda založená na analýze COI genu mitochondriální DNA, které by usnadnily identifikaci neznámých či sporných jedinců, nebo jejich reklasifikaci, jelikož identifikace jedinců mer na základě DNA je spolehlivým, dostupným a efektivním řešením.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na biologickou a molekulárně genetickou charakteristiku fytoplazmy '*Ca. Phytoplasma prunorum*' (ESFY), významného patogena meruněk, a jejích vektorů, zejména mery *Cacopsylla pruni*.
2. Molekulární detekce a genotypizace zástupců r. *Cacopsylla pruni* za použití DNA markerů, pomocí metody PCR a sekvenování, bioinformatická analýza získaných sekvenčních dat.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy jsou obligátní prokaryotní patogeny rostlin třídy *Mollicutes*, oddělení *Tenericutes*, ve kterém tvoří samostatnou monofyletickou skupinu (IRPCM, 2004).

Jejich buňky postrádají buněčnou stěnu a jsou obklopeny pouze jednotkovou membránou. Buňky jsou proto pleiomorfní, jejich tvar je rozmanitý, od kulovitého, přes oválný, až po protáhlý. Velikost jednotlivých buněk se pohybuje od 200 nm do 500 nm, u protáhlých buněk může dosahovat až 800 nm. Buňky jsou citlivé vůči tetracyklinovým antibiotikům, ale ne vůči penicilínu. Membrány fytoplazem jsou citlivé vůči hypotonickým solným roztokům, ale k digitoninu jsou rezistentní (IRPCM, 2004; Firrao *et al.*, 2005; Marcone *et al.*, 2014; Namba, 2019).

Fytoplazmy kolonizují sítkovce floému, vzácně také parenchymatické buňky cévnatých rostlin. U vektorových zástupců hmyzu sajícího rostlinnou šťávu osídlují střeva, hemolymfu, slinné žlázy, ale i další orgány, mohou také způsobit jejich předčasnou smrt. V rostlinných hostitelích vyvolávají komplex symptomů jako je virescence, fylodie, sterilita, abnormální prodloužení internodií, proliferaci, a mnoho dalších, méně specifických příznaků (IRPCM, 2004; Hogenhout *et al.*, 2009; Bertaccini *et al.*, 2014). Fytoplazmy tedy patří k jednomu z mála patogenů, kteří mají hostitele jak v živočišné, tak v rostlinné říši.

Přenos fytoplazem je možný pomocí hmyzích vektorů, lidskou činností nebo experimentální kokotici. Pomocí lidské činnosti se fytoplazmy rozšiřují vegetativními způsoby množení pěstovaných rostlin, štěpováním nebo řízkováním. Fytoplazmy nelze přenášet z rostliny na rostlinu nářadím, ani rostlinnou mízou (Kiss *et al.*, 2019).

Hmyzí vektorů přenášející fytoplazmy spadají do řádu polokřídých (Hemiptera). Vektorové druhy patří do tří skupin, a to čeledi křískovitých (Auchenorrhyncha: Cicadellidae), infrařádu svítilky (Auchenorrhyncha: Fulgoromorpha) a čeledi merovitých (Sternorrhyncha: Psyllidae) (Bertin *et al.*, 2013). Všechny známé vektory fytoplazem v rámci čeledi *Psyllidae* se řadí do rodu *Cacopsylla* (Bertaccini *et al.*, 2019a).

Většina vektorů fytoplazem jabloní a peckovin je univoltinních, výjimkou jsou vektorů přenášející fytoplazmu chřadnutí hrušně ('*Candidatus Phytoplasma pyri*'), kteří jsou polyvoltinní. U univoltinních přenašečů nedochází k překryvu generací, mají tedy pouze jednu generaci ročně. Vektorů přezimují většinou na jehličnanech a na jaře se vracejí na příslušné hostitelské rostliny. Řadí se mezi ně oligofágní nebo polyfágní druhy.

Hostitelský rozsah pro oligofágní druhy bývá omezen na jednu čeleď rostlin. Tato specializace vede k otevřenému nebo uzavřenému cyklu šíření fytoplazem. Otevřené cykly nastávají, když vektorů přenášejí fytoplazmy z jednoho rostlinného druhu na jiný rostlinný druh. Naopak uzavřené cykly nastávají, pokud jsou fytoplazmy vektory přenášeny pouze mezi stejnými hostitelskými rostlinami. Polyvoltinní přenašeči přezimují jako dospělí jedinci přímo na hostitelských rostlinách nebo v jejich blízkosti, v důsledku toho dochází k překryvu generací a mají tedy několik generací ročně (Seemüller *et al.*, 2004; Alma *et al.*, 2015; Bertaccini *et al.*, 2019b).

3.2 Objev fytoplazem a jejich klasifikace

Po celém světě se u rostlin vyskytuje mnoho onemocnění vykazujících podobné symptomy, například zakrslost, metlovitost či žloutenka. Tyto symptomy mohou být způsobeny různými patogeny. Celá řada onemocnění, u kterých dnes již víme, že jsou vyvolány fytoplazmami, byla původně (před jejich objevem) považována za virového původu, jelikož nebyla možná kultivace patogenu *in vitro* v bezbuněčném médiu, vektorem byl hmyz a symptomy onemocnění byly podobné právě virovým onemocněním, přestože žádné virové částice nikdy nebyly s onemocněními spojeny (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008).

Nejstarší záznamy o onemocnění vyvolané fytoplazmami jsou staré zhruba 1 000 let a pocházejí z Číny, kde v říši Sung v letech 960–1279 n. l. byly pivoňky infikované fytoplazmou vykazující květovou virescenci ceněny jako nejvzácnější a nejkrásnější odrůda této rostliny (Maramorosch, 2011).

Přítomnost patogenu byla poprvé zjištěna v roce 1967 v Japonsku, kdy byly pomocí elektronové mikroskopie v sítkovících morušovníku pozorovány struktury podobné buňkám zvířecích a lidských mykoplazmat. Objevená fytoplazma byla později označena jako původce zakrslosti moruší. Tato choroba je škodlivá a má negativní dopady na produkci listů moruše, které jsou jediným zdrojem potravy bource morušového, a tím způsobuje značné škody v hedvábnickém průmyslu. Na základě podobností s živočišnými mykoplazmami byl pro tyto rostlinné patogeny navržen název „mykoplazmám podobné organismy“ (MLOs, mycoplasma-like organism) (Doi *et al.*, 1967; IRPCM, 2004).

Později se ukázalo, že mnohá onemocnění, za jejichž původce byly považovány viry, jsou ve skutečnosti vyvolány MLOs. S rozvojem znalostí a rozšiřujícím se okruhem chorob vyvolaných fytoplazmami bylo nutno zavést jejich klasifikaci. Nejprve byla identifikace

a klasifikace fytoplazem založena pouze na biologických vlastnostech, jako jsou symptomy indukované v infikovaných rostlinách, okruh rostlinných hostitelů a interakce s hmyzími vektory (Doi *et al.*, 1967; Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008). U rostlin vykazujících symptomy byl následně pomocí elektronové mikroskopie potvrzen či vyvrácen výskyt fytoplazmových buněk v sítkovicích floému infikovaných rostlin (IRPCM, 2004).

V roce 1994 byl oficiálně přijat triviální název fytoplazma, který nahradil do té doby užívané pojmenování „mykoplazmám podobné organismy“ (mycoplasma-like organism) (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1993; 1997). Anglický název 'phytoplasma' pochází původem z řečtiny a je složen ze dvou slov, a to phytos = rostlina a plasma = zformovaný (IRPCM, 2004).

Významný zvrat ve zkoumání fytoplazem a jejich vektorů nastal s rozvojem metod molekulární biologie, které umožnily molekulární charakterizaci fytoplazem. První taxonomické rozdělení bylo založeno na genetické variabilitě konzervativního genu pro 16S rRNA a jeho analýze na základě polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) za použití 17 restrikčních endonukleáz. Fytoplazmy byly rozděleny do 14 hlavních skupin označovaných jako 16Sr skupiny. Těchto 14 hlavních skupin bylo následně rozděleno do 46 podskupin (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998).

Později bylo zjištěno, že vytvoření fylogenetického systému vycházejícího z jediného, vysoce konzervativního genu 16S rRNA je nedostatečné, a to zejména pro rozlišení fytoplazem do podskupin (Streten *et al.*, 2005). Pro detailnější rozlišení a identifikaci fytoplazem se začaly využívat i méně konzervované, variabilnější geny. Například se používá variabilnější sekvence genů pro ribozomální proteiny (*rp - rps3, rpl22*), které umožňují identifikaci více skupin pomocí RFLP analýzy než gen 16S rRNA. Dalšími konzervativními geny jsou gen *tuf* kódující elongační faktor Tu, gen *secA* kódující molekulární motor *secA* účastníci se bakteriální sekreční dráhy Sec, gen *secY* kódující hlavní transmembránovou podjednotku bakteriální sekreční dráhy Sec, gen *amp1* kódující antigenní povrchový membránový protein, gen *vmp1* kódující membránový protein vakuol, gen *stamp* kódující antigenní povrchový membránový protein, gen *nusA* pro transkripční faktor *nusA* a gen *hflb* (Seemüller *et al.*, 1998; Hodgetts *et al.*, 2008; Ntushelo *et al.*, 2010; Danet *et al.*, 2011; Contaldo *et al.*, 2021).

Vzhledem k přibývajícím informacím a rozvíjejícím se molekulárním technikám byla v roce 1994 vytvořena nová taxonomická jednotka, rod '*Candidatus Phytoplasma*'. Klasifikace v rámci tohoto taxonu je založena na základě analýzy variability genu 16S rRNA. Aby byla detekovaná fytoplazma zařazena do tohoto druhu, popis by měl

odkazovat na jedinou, jedinečnou sekvenci genu 16S rRNA, která je větší než 1 200 bp. Obecně lze izolát popsat jako nový druh, pokud jeho genová sekvence 16S rRNA vykazuje menší než 97,5% podobnost se sekvencí jakéhokoliv již dříve popsaného druhu rodu 'Candidatus Phytoplasma'. V některých případech mohou odlišné druhy vykazovat identitu genové sekvence 16S rRNA i vyšší než 97,5 %, ale musí být splněna jedna z dalších podmínek. Za prvé, musí se jednat o ekologicky jasně oddělené populace; za druhé, obě fytoplazmy musí být přenášeny různými vektory; za třetí, obě mají odlišného rostlinného hostitele nebo za čtvrté, je jejich chování odlišné u stejné hostitelské rostliny a musí existovat důkazy o molekulární diverzitě stanovené pomocí DNA hybridizace, sérologické reakce nebo PCR (IRPCM, 2004).

V současnosti rozlišujeme čtyřicet devět druhů 'Candidatus Phytoplasma' a třicet šest 16Sr skupin a několik desítek podskupin (Bertaccini *et al.*, 2022). Rozdělení do 16Sr skupin vychází ze štípání amplikonu získaného v nested-PCR pomocí primeru R16F2 a R16R2 restrikcí endonukleázami. Tyto dva primery se standardně používají pro PCR detekci a identifikaci fytoplazem (Lee *et al.*, 1998; Bertaccini, 2019c).

3.3 Genom fytoplazem

Fytoplazmy jsou grampozitivní bakterie, jejichž genom je tvořen jedním kruhovým nebo v některých případech lineárním chromozómem a několika malými plazmidy, avšak například 'Candidatus Phytoplasma mali' nenesou žádné plazmidy (Firrao *et al.*, 2005; Oshima *et al.*, 2013). Velikost chromozomu fytoplazem se pohybuje od 530 kb do 1 350 kb a vykazuje relativně nízký obsah G+C bází okolo 23–29 % (Wang *et al.* 2018). Pro fytoplazmy jsou charakteristické specifické pozice nukleotidů genu 16S–23S rRNA, a to adenin v pozici 242, thymin v pozicích 286 a 1247, kromě toho obsahují jedinečnou sekvenci oligonukleotidů 5'-CAAGAYBATKATGKTAGCYGGDCT-3' v oblasti genu 16S rRNA (IRPCM, 2004). Mají dva rRNA operony v genu 16S rRNA a obsahují malé množství genů pro tRNA (Wang *et al.*, 2018). U některých fytoplazem je u těchto dvou operonů zřejmá heterogenita. Narozdíl od ostatních zástupců třídy *Mollicutes*, u kterých kodon UGA kóduje aminokyselinu tryptofan, má kodon UGA u fytoplazem funkci stop kodonu (IRPCM, 2004; Oshima *et al.*, 2013). Genomy fytoplazem dále obsahují shluky opakovaných sekvencí, které se nazývají potenciální mobilní jednotky (PMU). Vzhledem k opakované přítomnosti PMU, jejich genovému obsahu a pořadí genů se nejspíše jedná o replikativní, složené transpozóny (Bertaccini *et al.*, 2019b).

Jejich genom je obecně malý, redukovaný a má se za to, že k této redukci došlo v důsledku jejich životních cyklů, jelikož se přizpůsobili striktně parazitickému způsobu života. Ztratily velký počet genů, které jsou považované za nezbytné pro život. Jejich redukovaný genom obsahuje pouze malý počet genů spojovaných se základními buněčnými funkcemi a metabolismem fytoplazem. Vzhledem k absenci těchto genů jsou závislé na dodání produktů těchto metabolických drah svými hostiteli (Oshima *et al.*, 2013). Fytoplazmy mají geny nezbytné pro glykolýzu a další geny související s oxidativní fosforylací, Krebsovým cyklem, pentózofosfátovým cyklem, metabolismem galaktózy, ATP syntázy, syntézou mastných kyselin, aminokyselin a nukleotidů *de novo* neobsahují (Christensen *et al.*, 2005).

Oshima *et al.* (2004) sestavili první kompletní genom fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma asteris' infikující chryzantému (*Chrysanthemum* sp.). Doposud bylo popsáno 18 kompletních genomů fytoplazem, a to '*Candidatus* Phytoplasma australiense' (kmeny PAa a NZSb11), '*Candidatus* Phytoplasma mali' (kmen AT), aster yellows witches'-broom phytoplasma (kmeny OY-M a AYWB), onion yellow phytoplasma, maize bushy stunt phytoplasma (kmen M3), Paulownia witches'-broom phytoplasma (kmen Zhengzhou), '*Candidatus* Phytoplasma ziziphi' (kmeny jwb-nky a hebei-2018), '*Echinacea purpurea*' witches'-broom phytoplasma, '*Brassica napus*' phytoplasma, '*Candidatus* Phytoplasma tritici', periwinkle leaf yellowing phytoplasma, mulberry dwarf phytoplasma (kmen MDGZ-01), '*Candidatus* Phytoplasma luffae' (kmen NCHU2019), rapeseed phyllody phytoplasma, '*Catharanthus roseus*' aster yellows phytoplasma (kmen De Villa) (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Orlovskis *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Town *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2019; Coetzee *et al.*, 2019; Cho *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022).

3.4 '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'

Fytoplazma evropské žloutenky peckovin (ESFY, European stone fruit yellows phytoplasma) je významný patogen infikující zástupce rodu *Prunus* v Evropě. Způsobuje chlorotické svinutí listů meruněk (*Prunus armeniaca* L.), leptonekrózu slivoní japonských (*Prunus salicina* L.) a žloutenku broskvoní (*Prunus persica* L.). Poprvé bylo onemocnění popsáno ve 30. letech 20. století jako chřadnutí japonských slivoní (*Prunus salicina*) v Itálii a Francii. Později bylo označováno jako chlorotická svinutka listů meruňky (ACLR, apricot

chlorotic leaf roll) (Ciešlínska, 2011). V současnosti jsou všechny tyto symptomy souhrnně označovány jako evropská žloutenka peckovin (ESFY, European stone fruit yellows).

V roce 2004 byl původce tohoto onemocnění na základě analýzy 16S rRNA, transkribovaného mezerníku 16S–23S rDNA a neribozomálního imunodominantního genu pro membránový protein (*impl*) popsán jako nový samostatný druh fytoplazmy, a to '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. Následně byla provedena analýza těchto ribozomálních a neribozomálních genů pomocí RFLP analýzy za užití univerzálních a specifických primerů, pomocí kterých se specificky amplifikují některé nebo všechny skupiny 'apple proliferation' (AP). Poté po následném štěpení restriční endonukleázou *AluI* vykazovaly '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' stejný restriční profil. Tyto fytoplazmy lze od sebe odlišit pomocí restričních endonukleáz *RsaI* a *SspI*, kdy *RsaI* štěpí odlišně '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' od '*Candidatus Phytoplasma mali*' a '*Candidatus Phytoplasma pyri*', zatímco *SspI* štěpí '*Candidatus Phytoplasma mali*' v místě, které '*Candidatus Phytoplasma pyri*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' chybí. Náhodně klonované fragmenty chromozomální DNA byly použity v analýze southern blot k charakterizaci a diferenciaci fytoplazem skupiny AP, tyto fragmenty byly použity jako sondy a byly získány odlišné RFLP vzorce. Pulzní gelové elektroforézy bylo využito k odhadu velikosti genomu fytoplazem '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' rozlišením chromozomů plné délky anebo chromozomálních makrorestričních fragmentů, které byly vytvořeny štěpením. Výsledky ukázaly odlišné velikosti chromozomů těchto tří patogenů a byly vytvořeny restriční mapy (Seemüller *et* Schneider, 2004). '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' je patogen příbuzný s dalšími významnými patogeny ovocných dřevin, a to '*Candidatus Phytoplasma mali*', která způsobuje proliferaci jabloní (AP, apple proliferation) a '*Candidatus Phytoplasma pyri*' indukující chřadnutí hrušní (PD, pear decline) a chlorotickou svinutku listů broskvoní (PYRL, peach yellow leaf roll) (IRPCM, 2004; Marcone *et al.*, 2010, Danet *et al.*, 2011). Společně jsou tyto fytoplazmy řazeny do 16SrX skupiny (fytoplazmy proliferace jabloně, 'apple proliferation group') (Seemüller *et* Schneider, 2004).

Vzhledem k vysoké hostitelské specifitě fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', a její vazbě na rod *Prunus*, patří mezi nejčastější přirozené hostitele meruňka obecná (*Prunus armeniaca* L.), slivoň švestka (*Prunus domestica* L.), broskvoň obecná (*Prunus persica* L.), slivoň japonská (*Prunus salicina* L.), trnka obecná (*Prunus spinosa* L.).

Nejcitlivěji reagují na onemocnění ESFY stromy meruněk, broskvoní a slivoní japonských, naopak vysokou toleranci k onemocnění ESFY vykazuje slivoň švestka.

Typické příznaky infekce jsou svinutka, žloutnutí anebo červenání listů, případně jejich předčasný opad, plody bývají menší, dozrávají předčasně, opadávají či zasychají. Tyto typické příznaky se projevují na jednotlivých listech, větvích i celých stromech. Dochází také k proliferaci větví, jejich zasychání nebo metlovitosti výhonů. Infikovaný strom je také ve většině případů menšího vzrůstu (Marcone *et al.*, 2010; Ciešlínska, 2011; Nečas *et al.*, 2015).



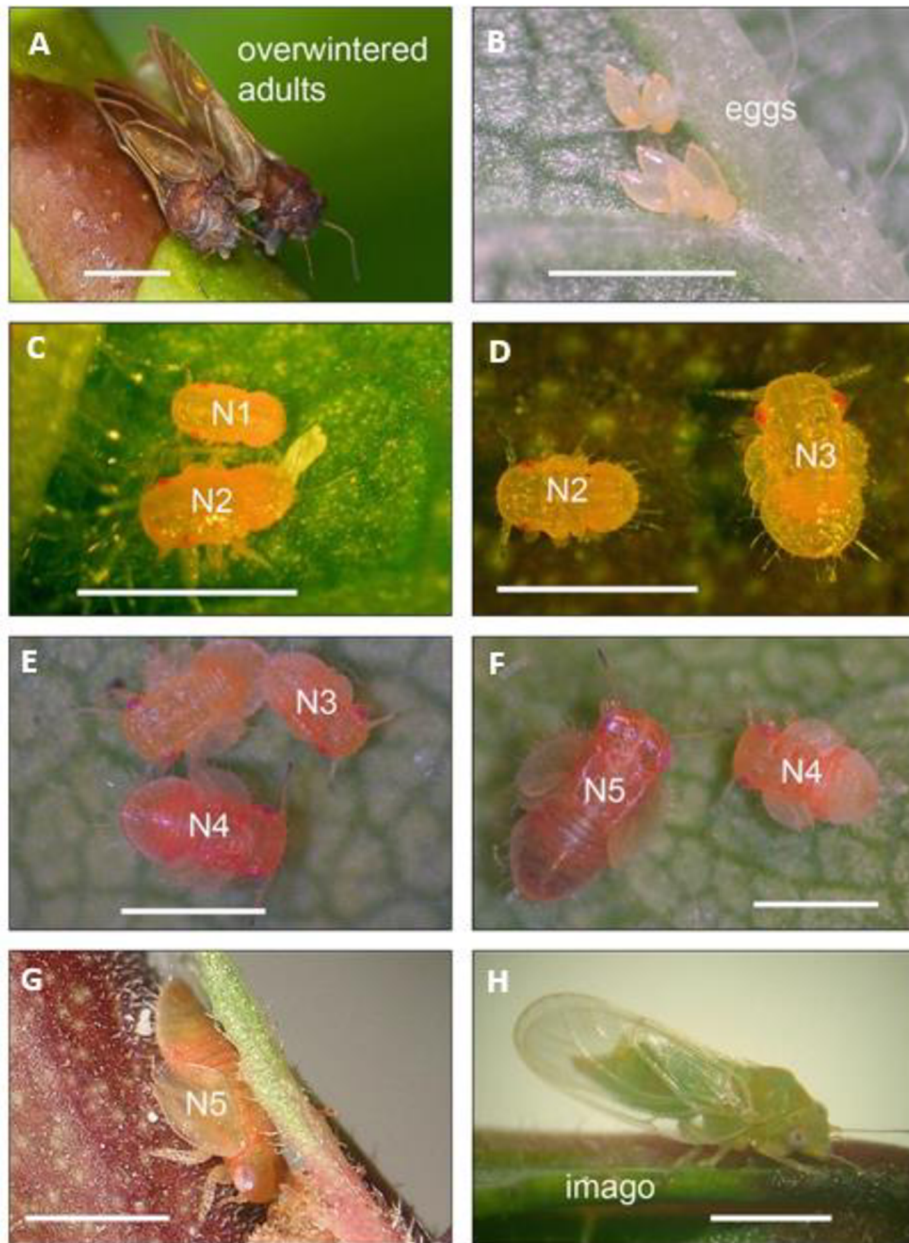
Obrázek 1: Příznaky onemocnění ESFY, svinutka listů, na meruňce (D. Šafařová).

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*' se v současnosti vyskytuje ve většině zemí jižní a střední Evropy, a to v Albánii (Myrta *et al.*, 2003), Bělorusku (Valasevich *et al.*, 2016), Belgii (Olivier *et al.*, 2004), Bosně a Hercegovině (Delic *et al.*, 2005), Bulharsku (Topchiiska *et al.*, 2000), České republice (Navrátil *et al.*, 1998), Německu, Maďarsku (Lorenz *et al.*, 1994), Řecku, Švýcarsku (Seemüller *et al.*, 1995), Polsku (Ciešlínska, 2011),

Rumunsku (Ploaie *et al.*, 1980), Srbsku (Myrta *et al.*, 2006), Slovinsku (Mehle *et al.*, 2011), Španělsku (Llacer *et al.*, 1986), Velké Británii (Davies *et al.*, 2000), Rakousku, Chorvatsku, na Slovensku, a Ukrajině (Steffeck *et al.*, 2012). Výskyt byl dále také zaznamenán v Turecku (Ulubaş Serçe *et al.*, 2006), Ázerbajdžánu (Balakishiyeva *et al.*, 2010), Tunisu (Khalifa *et al.*, 2011), Egyptě (Steffeck *et al.*, 2012) a Íránu (Hashemi-Tameh *et al.*, 2014).

3.5 Mera trnková (*Cacopsylla pruni*)

Mera trnková [*Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763)] je striktně oligofágní druh vázaný na stromy rodu *Prunus* spp. Její životní cyklus obvykle zahrnuje stádium vajíčka, pět larválních instarů a poté následuje stádium dospělosti, viz obrázek 2 (Hodkinson, 2009). Dospělí jedinci nové generace pobývají a živí se na svých hostitelských stromech až do začátku července a poté se přesunují do zimovišť (Carraro *et al.*, 2004). Koncem zimy nebo brzy na jaře, záleží na klimatických podmínkách a geografických oblastech, dospělí jedinci migrují ze zimovišť zpět na hostitelské rostliny rodu *Prunus* spp. (Bertaccini *et al.*, 2019a). Vyskytuje se v mnoha evropských zemích, jako je Itálie (Carraro *et al.*, 1998), Francie (Yvon *et al.*, 2004), Španělsko (Laviña *et al.*, 2004), Česká republika (Fialová *et al.*, 2004), Švýcarsko (Ramel *et al.*, 2004), Německo (Jarausch *et al.*, 2007), Bosna a Hercegovina (Delić *et al.*, 2008), Turecko (Ulubaş Serçe *et al.*, 2011), Rakousko (Lethmayer *et al.*, 2011) a Bulharsko (Etropolska *et al.*, 2016). Do roku 2013 byla považována za jeden druh a hlavního vektora, ale pomocí genetické analýzy vnitřního transkribovaného mezerníku (ITS2) bylo zjištěno, že populace mer lze rozlišit na dvě subpopulace. Nejspíše se jedná o dva kryptické druhy, prozatím označované jako *C. pruni A* a *C. pruni B*, které mají podobnou biologii i morfologii. Tyto dva kryptické druhy se překrývají v oblasti kolem Středozemního moře a tamní pozorování naznačují, že oba jsou potenciálními vektory '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (Peccoud *et al.*, 2013; Bertaccini *et al.*, 2019a).



Obrázek 2: Životní stádia mery trnkové (*Cacopsylla pruni*) (Bertaccini *et al.*, 2019a).

Legenda: A: přezimující dospělý jedinec (overwintered adult); B: vajíčka (eggs); C–G: larvální instary; N1: první larvální instar; N2: druhý larvální instar; N3: třetí larvální instar; N4: čtvrtý larvální instar; N5: pátý larvální instar; H: imago

Molekulární determinace vektoru mery trnkové

Mery jsou si fenotypově velmi podobné, a proto se špatně identifikují a ke správnému druhovému určení jsou zapotřebí specializovaní entomologové. Vzhledem k těmto skutečnostem se rozvíjejí přístupy, které umožní vektory identifikovat pomocí

molekulárních technik na základě analýzy genetické variability konkrétních genů či konkrétních genomických oblastí. Identifikace jedinců mer na základě DNA je spolehlivé, dostupné a efektivní řešení.

Vhodná pro genetickou analýzu a odlišení populací vektorových druhů je analýza ribozomální RNA a analýza vybraných jaderných genů. Oblíbenými přístupy, které umožňují analyzovat variabilitu populace specificky získanými fragmenty DNA, je náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) a mikrosatelity (SSRs), protože umožňují identifikovat jednonukleotidové polymorfismy.

Základním markerem široce využívaným pro identifikaci živočišných druhů, zejména formou DNA barcodingu, je gen kódující cytochrom oxidázu I (COI). Dále se pro genetickou analýzu využívá ribozomální RNA (rRNA) a vnitřní transkribovaný mezerník 16S–23Sr DNA (ITS2). I když mitochondriální a ribozomální DNA většinou poskytuje informaci o mezidruhové variabilitě většinou mezi druhy, určitý polymorfismus můžeme najít i uvnitř druhů, zvláště pokud jsou porovnány vzdálené populace (Bertin *et* Bosco, 2013; Peccoud *et al.*, 2013; Oettl *et* Schlink, 2015).

Mitochondriální gen kódující podjednotku I cytochrom oxidázy se u hmyzu používá jako základní marker pro studium jejich evoluce a vývoje, protože obsahuje jen málo genů, které jsou ale vysoce konzervované, a předpokládá se, že mutace v nich probíhají konstantní rychlostí. Cytochrom oxidáza je enzymatický membránový komplex, který je složen z 8 až 13 podjednotek. Tři největší podjednotky, a to I, II a III jsou kódovány přímo v mitochondriální DNA. Její podjednotka I je největší podjednotkou ze tří již zmíněných. Právě podjednotka cytochrom oxidáza I má vlastnosti, díky kterým je vhodná jako molekulární marker pro evoluční studie. Mezi tyto vlastnosti patří zachovaná velikost a struktura napříč všemi zkoumanými aerobními organismy, a to, že obsahuje vysoce konzervované i variabilní oblasti (Lunt *et al.*, 1997).

Analýza ITS2 umožnila vyvinutí rychlého molekulárního diagnostického testu, který umožňuje rychlou identifikaci jedinců *Cacopsylla pruni* (Peccoud *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že tento druh zahrnuje dvě vysoce geneticky odlišné skupiny (skupina A a B), které jsou si morfologicky podobné. Na základě analýzy sekvenční variability jedinců původem převážně z Francie, ale i dalších zemí např. Itálie, Španělska, Německa a České republiky byly navrženy skupinově specifické primery, v kombinaci jeden univerzální primer a dva specifické primery. Výsledkem byly velikostně odlišné PCR amplikony, které umožňují od sebe tyto dvě skupiny bezpečně odlišit. Vzorky jedinců byly také otestovány

pomocí 9 specifických mikrosatelitů, aby byla možná kontrola výsledků PCR amplikonů, které určují výsledné genotypy. Primery byly vybrány tak, aby trojice primerů umožňovaly identifikaci skupin pomocí velikosti amplikonu produkovaného v jediné PCR. Názvy primerů obsahují písmena A nebo B k určení genotypové skupiny, na kterou cílí. Bylo zjištěno, že určené genotypy pomocí PCR odpovídají genotypům, které byly již předtím určeny pomocí 9 mikrosatelitů. Výsledky ukazují, že vnitřní transkribovaný mezerník by měl být výhodný pro fylogenetickou analýzu nejen v rámci rodů, ale i pro rozlišení kryptických druhů v rámci komplexů (Peccoud *et al.*, 2013).

3.6 Interakce hostitelské rostliny a fytoplazmy

Ke kolonizaci floému dochází ve všech částech rostliny (Marcone *et al.*, 2010; Oshima *et al.*, 2013; Bertaccini *et al.*, 2019a). Přestože někteří autoři detekovali přítomnost fytoplazem v semenech, obecně se předpokládá, že přenos fytoplazem semeny není možný (Nipah *et al.*, 2007; Nečas *et al.*, 2008; Nečas *et al.*, 2015). Fytoplazmy odlišně kolonizují rostliny v závislosti na typu patogenu, vlastnostech hostitele a jeho specifických reakcích (Marcone *et al.*, 2010). V závislosti na těchto faktorech intenzita symptomů indukovaných u napadených rostlin velmi kolísá; druhy a kultivary mohou být k infekci fytoplazmami silně vnímavé, středně vnímavé, mírně vnímavé, tolerantní nebo rezistentní (Lee *et al.*, 2000). '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' může přetrvávat v nadzemních částech infikovaných stromů během vegetačního klidu, většinou však patogen přetrvává v kořenech, kde jsou po celý rok přítomny neporušené sítkovice. Z kořenů následně na jaře dochází k rekolonizaci nadzemních částí rostlin, když se utvoří nový floém. Systemická kolonizace nemocných stromů probíhá od března do pozdního podzimu (Marcone *et al.*, 2010). Změny na úrovni buněk souvisí s množением fytoplazem a týkají se především buněčné stěny, kdy dochází k jejímu ztloustnutí, okluzi plazmodezmat kalózou či k oddělení plazmalemy. Toto vede k předčasnému ucpání kalózou a následnému selhání sítkovic (Favali *et al.*, 2004). Jakmile dochází k selhávání sítkovic v blízkosti kambia, začíná toto hyperaktivní pletivo produkovat tzv. náhradní nové elementy floému, avšak i zde může docházet k nekróze sítkovic (Lepka *et al.*, 1999; Maust *et al.*, 2003).

3.7 Interakce vektoru a fytoplazmy

Typický přenos fytoplazem obvykle sestává ze tří fází. První fází je doba akvizičního sání, kdy jsou buňky fytoplazem nasávány ze sítkovic floému vektorem a dochází

k infikování hostitele. Následuje období latence, které je nezbytné pro namnožení fytoplazmy a její cirkulaci uvnitř těla vektora, včetně slinných žláz. Poslední fází je období inokulace, kdy dochází k inokulaci zdravé, hostitelské rostliny pomocí infekčního hmyzu, který nasává rostlinnou šťávu ze sítkovic floému, viz obrázek 3 (Alma *et al.*, 2015). Doba trvání jednotlivých fází je pro každý druh specifická, avšak ve většině případů trvá první fáze několik dní, poté následuje několika týdenní období latence, a nakonec krátké období inokulace rostlin (Bertaccini *et al.*, 2019a).

3.7.1 Období akvizičního sání

K akvizičnímu nasátí fytoplazmy dochází ve stádiu nymf (Alma *et al.*, 2015). Vzhledem k tomu, že u mery trnkové nedochází k transovariálnímu přenosu, k infekci vektora dochází *de novo*. Jelikož nymfy vektorů žijí přisedle a z rostliny na rostlinu se přemísťují pouze chůzí či skákáním, musí se líhnout již na infikovaných rostlinách, aby došlo k úspěšnému akvizičnímu nasátí fytoplazmy. Účinnost vektorového přenosu u zástupců čeledi křískovitých je zesílena tím, že žluté infekční listy infikovaných rostlin jsou pro ně atraktivnější než zdravé zelené listy. Akviziční sání může mít také různou účinnost v závislosti na fázi instaru. Například u fytoplazmy stolburu (*Candidatus Phytoplasma solani*) jsou nymfy schopny získat fytoplazmu až od třetího instaru. Toto zjištění by mohlo být důležitým aspektem při řešení strategií ochrany před škůdci (Bertaccini *et al.*, 2019a).

3.7.2 Období latence

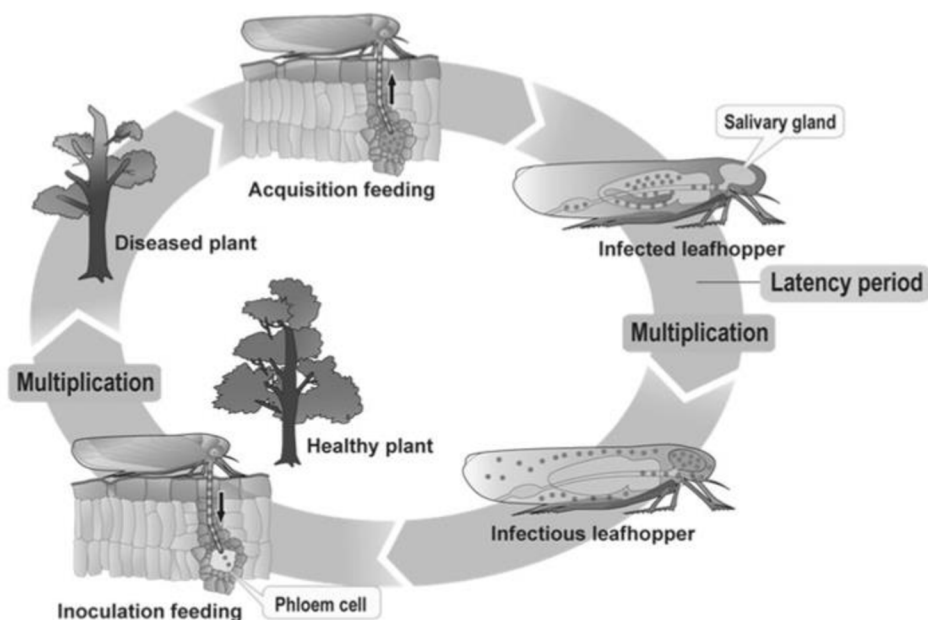
Délka období latence závisí na rychlosti množení fytoplazem v těle vektora. Pohybuje se v rozmezí několika dní až několika měsíců, navíc během období latence většina nymf dospěje do stádia dospělce (Munyaneza *et al.*, 2013; Bertaccini *et al.*, 2019a). Během období latence dochází k cirkulaci a množení fytoplazmy v těle hmyzu. Fytoplazma nejprve pronikne do epiteliálních buněk dutiny ústní, poté vstupuje do tělní dutiny, cirkuluje v hemolymfě a pomnožuje se. Aby se hmyz stal infekčním, musí fytoplazma proniknout až do buněk slinných žláz, kde dochází k dalšímu pomnožování. Odtud se pak během sání dostává do nového hostitele. Pokud fytoplazma pronikne do hemolymfy, ale není schopná kolonizovat buňky, hmyz se stane konečným hostitelem, ale není infekční (Marccone *et al.*, 2010; Bertaccini *et al.*, 2019a). Mezi faktory, které mohou ovlivnit délku období latence, patří klimatické změny. Tyto změny mohou pozitivně či negativně ovlivnit nejen

patogen, ale také rostlinného a hmyzího hostitele. Vlivem změn může dojít k různým reakcím. Zvyšující teplota může omezovat životní cyklus patogena, naopak narůstající koncentrace atmosférického oxidu uhličitého může patogenu poskytnout příznivější podmínky (Galetto *et al.*, 2011). Následkem bude kratší či delší období latence v závislosti na ročním období. Přenašeči s dlouhou latentní fází přenášejí fytoplazmu převážně po přezimování při zpětné migraci do sadů, kdežto přenašeči s krátkou latentní fází mohou přenášet fytoplazmu již před migrací, a i po přezimování (Bertaccini *et al.*, 2019a).

3.7.3 Období inokulace

Vzhledem k tomu, že nymfy nejsou schopny létat, nemůže dojít k jejich přesunu z infikované rostliny na zdravou rostlinu. Inokulace zdravých rostlin probíhá za pomoci dospělých jedinců a může k ní dojít v různých obdobích sezóny v závislosti na biologii vektorů a jejich infekčním stavu (Bertaccini *et al.*, 2019a).

Po inokulaci zdravé rostliny dochází k pomnožení fytoplazmy v sítkovicích floému a rostlina se stává infekční. Následně může dojít opět k první fázi přenosu fytoplazmy, a to k akvizičnímu sání fytoplazmy vektorem pomocí nasátí rostlinné šťávy.



Obrázek 3: Životní cyklus fytoplazem (Bertaccini *et al.*, 2019a).

3.8 Ekonomický význam ESFY a jeho kontrola

Problém častého a hromadného odumírání meruněk nepatří k novým a tento jev narůstá v důsledku změn klimatu (Nečas *et al.*, 2015). Evropská žloutenka peckovin vede k velkým ekonomickým škodám u dřevin rodu *Prunus* v celé Evropě (Cieslińska, 2011). V České republice jsou případy evropské žloutenky peckovin hlášeny již více než 20 let, avšak vysoké procento infikovaných stromů je bezpříznakové (Navrátil *et al.*, 2008; Nečas *et al.*, 2015). K největším ekonomických ztrátám dochází v sadech meruněk a slivoní japonských, kde míra infekce sadů může být až 50 % a po výsadbě se tyto sady stávají neproduktivními již po osmi až deseti letech (Marcone *et al.*, 2010).

Zásadní význam pro omezení šíření fytoplazmóz jsou preventivní a fytosanitární opatření, jako je například používání a množení certifikovaných materiálů, kontrola výskytu zdrojů infekce a jejich případná likvidace, kontrola vektorů a regulace jejich výskytu (sledování náletů přezimujících jedinců a stanovení podílu infikovaných jedinců). Dostatečná kontrola vektorů však není často možná, protože přenašeči nejsou v mnoha případech známi a insekticidy nelze vždy bezpečně bez ohrožení kvality plodů aplikovat. Největší riziko týkající se inokulace zdravých rostlin infekčními vektory se objevují na konci léta a začátku podzimu. Před sklizní totiž buď nedochází k postřiku rostlin insekticidy, nebo jsou naneseny jen v malém množství, aby nedošlo k ohrožení kvality plodu. Problémem může být také odolnost hmyzu vůči insekticidům. Mezi používané insekticidní prostředky užívající se především při jarních náletech přezimujících generací, patří např. Mospilan 20 SP, Sulka, Calypso 480 SC nebo Cascade 5 EC. Mezi ekologičtější přípravky rock effect. Přenosu a šíření fytoplazem je tedy velmi obtížné zabránit a fytoplazmami již infikované stromy nelze vyléčit (Kocourek *et al.*, 2013; Bertaccini *et al.*, 2019a).

3.9 Metody detekce a identifikace fytoplazem

Přímá detekce fytoplazem pod světelným mikroskopem je obtížná, k jejich lokalizaci a identifikaci je potřeba barevné odlišení od ostatních struktur. Nejjednodušší mikroskopickou metodou je fluorescenční mikroskopie. Jednotlivé preparáty se obarví pomocí DNA fluorochromu DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), který se váže v oblastech DNA bohatých na AT. Výhodou této metody je rychlost, jednoduchá příprava a relativně nízké náklady. Nevýhodou této metody je skutečnost, že můžeme detekovat přítomnost fytoplazem v infikovaných rostlinách s vysokou koncentrací patogenu a nedokážeme je identifikovat (Seemüller, 1976; Nejat *et Vadamalai*, 2013).

Další metodou používanou pro detekci fytoplazem je skenovací (SEM) a transmisní (TEM) elektronová mikroskopie. V jednotlivých snímcích z elektronového mikroskopu můžeme lokalizovat fytoplazmy v pletivech, určit jejich tvar a velikost, avšak je obtížné odlišit fytoplazmy od jiných mikroorganismů nebo buněčných struktur, které mohou mít podobný tvar a strukturu. Elektronový mikroskop můžeme použít i k detekci jediné fytoplazmy, avšak nerovnoměrná distribuce fytoplazem a jejich nízké koncentrace v rostlině snižují šanci jejich nálezu. Na základě morfologických informací ale opět nelze určit, o jaký druh fytoplazmy se jedná (Devonshire, 2012; Nejat *et Vadamalai*, 2013; Lebsky *et Poghosyan*, 2014). Techniky elektronové mikroskopie jsou však časově náročně, vyžadují kvalifikovaný personál a finanční náklady na jejich provedení jsou vysoké (Sinclair *et al.*, 1992).

Mezi sérologické metody užívající se pro detekci fytoplazem, patří ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay) a jeho modifikace. Tato metoda je založena na specifické interakci antigenu a protilátky. Antigen nebo protilátka je zakotvena na pevný nosič. Poté dochází k přidání vzorku a vzniku vazby mezi antigenem a protilátkou. Na jednu z těchto složek je následně navázána sekundární protilátka značená enzymem. Poté je přidán substrát a enzym katalyzuje přeměnu tohoto substrátu na výsledný barevný produkt. Koncentrace produktu je přímo úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve zkoumaném vzorku a stanovuje se spektrofotometricky. Následně jsou připravovány monoklonální a polyklonální protilátky (Davis *et al.*, 1992; Loi *et al.*, 2002; Bertaccini *et al.*, 2019b). Pro diagnostické účely se používají protilátky specificky připravené proti konkrétní fytoplazmě, která musí být přítomna v rostlině ve vysoké koncentraci. Využívané jsou například protilátky proti fytoplazmě stolburu či proliferaci jabloně nebo proti exotické fytoplazmě '*Candidatus Phytoplasma palmae*' (Zreik *et al.*, 2001; Brzin *et al.*, 2003; Sasikala *et al.*, 2011).

Mezi molekulární metody, které se využívají pro detekci a identifikaci fytoplazem, patří DNA hybridizace, PCR, RFLP a sekvenování.

Nejpoužívanějším nástrojem k detekci a identifikaci fytoplazem je v současnosti PCR. Testy založené na PCR amplifikaci byly vyvinuty na začátku 90. let 20. století jako další pokročilá technika vhodná pro diagnostiku fytoplazmových onemocnění (Delić, 2012). Pro detekci a identifikaci fytoplazem byly navrženy univerzální nebo skupinově specifické primery, které byly založeny na vysoce konzervovaných sekvencích genu 16S rRNA nebo na základě sekvencí vnitřní oblasti mezerníku 16S–23Sr DNA či konzervovaných sekvencí genu pro ribozomální proteiny a elongačního faktoru tuf (Lee *et al.*, 2000).

PCR amplifikace je velmi citlivá metoda, avšak pro diagnostické účely zejména u rostlin, kde se fytoplazmy vyskytují v nízkém titru je nezbytné citlivost ještě zvýšit, proto je využívána tzv. nested-PCR, která zvyšuje senzitivitu i specifitu reakce (Delić, 2012).

Při PCR může dojít k nespecifické amplifikaci, kdy výsledné produkty neodpovídají očekávané velikosti nebo vzniká více nespecifických produktů (Navrátil *et al.*, 2005; 2007). Nevýhodou dvoukrokové (nested) PCR je větší pravděpodobnost kontaminace a získání falešně pozitivních výsledků (Delić, 2012). K falešně pozitivním výsledkům může dojít také díky kontaminaci vzorků nebo reagensů. Pro odhalení falešně pozitivních výsledků je potřebné výsledek PCR amplifikace potvrdit sekvenováním.

RFLP analýza se používá pro rozlišení již detekovaných fytoplazem do skupin a podskupin. Amplifikované fragmenty fytoplazmové DNA jsou štěpeny 17 různými restrikčními enzymy na specifických místech (Lee *et al.*, 1998; Delić, 2012).

Rozvoj metody real-time PCR přinesl nové možnosti pro detekci fytoplazem. Tato metoda zvýšila citlivost a rychlost detekce a zároveň se oproti nested-PCR snížilo riziko kontaminace. Kromě detekce umožňuje real-time PCR i kvantifikovat počet kopií fytoplazmové DNA ve vzorku (Martini *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 2019).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části bakalářské práce bylo otestováno celkem 49 vzorků mery trnkové [*Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763)], vektora fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. Mery byly odchyceny na šesti lokalitách na jižní Moravě, detailní informace o lokalitě a odchytu jsou shrnuty v tabulce 1. Odchycený hmyz byl po identifikaci roztržěn a DNA jedinců *Cacopsylla pruni* byla izolována a uskladněna v 96% ethanolu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 1: Základní informace o odchycích jedinců druhu *Cacopsylla pruni*.

Lokalita	Označení vzorků/jedinců	Datum odchytu
Olšany	351/9	11. 1. 2012
Olšany	352/5; 353/5,6,7,9	11. 1. 2012
Olšany	354/2	24. 12. 2011
Drahany	130/1,2,3	16. 4. 2018
Kalečník	141/1-10	27. 9. 2008
Lednice	81/39-46,48	18. 4. 2006
Valtice	21/1-10	7. 4. 2004
Velké Bílovice	24/1-10	7. 4. 2004

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Amresco, kat. č. 0710-500G)
- Deionizovaná voda
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific™, kat. č. R0611)
- Ethidium bromide (Biotium, kat. č. 40042)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, kat. č. 41002)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0243)
- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0323)

- Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide), 100 mg (Invitrogen, kat. č. H1398)
- MyFi™ mix (Bioline, kat. č. MFX-919209B)
- MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline, kat. č. BIO-37112)
- MyTaq™ Red Reaction Buffer 5x (Bioline, kat. č. BIO-21106)
- UltraPure™ Calf Thymus DNA Solution (Invitrogen, kat. č. 15-633-019)

Použité soupravy

- BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, kat. č. 4336697)
- FastGene Gel/PCR Extraction Kit (GeneFlow, kat. č. FG-91302)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740609.50)

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,1% bromfenolová modř v 30% glycerinu
- 50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): Za stálého míchání rozpustit 242 g Tris base v 800 ml dH₂O, poté přidat 100 ml 0,5M EDTA (pH 8) a 57,1 ml ledové kyseliny octové, doplnit do 1000 ml.

4.3 Použité přístroje a zařízení

- Centrifuga Prism™ mini (Labnet)
- Centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Dokumentační systém G:BOX (Syngene)
- Elektroforetická komora HU10 mini (Scie-Plas)
- Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hofer)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Minicentrifuga C1316 (Greg)
- Mixing Block MB-102 (Bioer)
- Thermocycler T personal (Biometra)
- Thermocycler T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- UV-transluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)

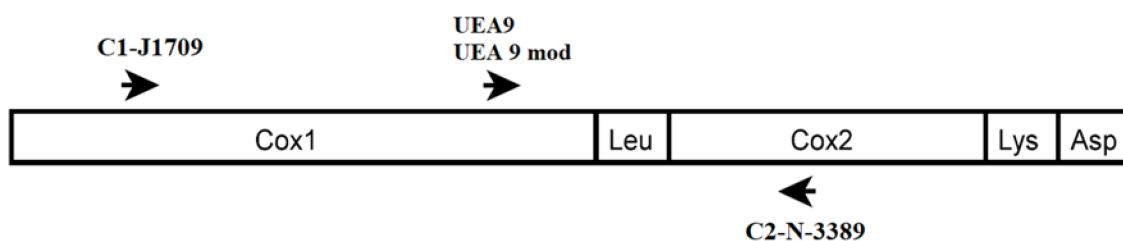
- Zdroj stejnosměrného napětí Power Station 300 (Labnet)

4.4 Použité metody

4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace fragmentu COI–II genů

Amplifikace dlouhého fragmentu mitochondriálního genu 16S rRNA v oblasti pro cytochrom oxidázu I a II byla provedena pomocí MyTaq™ DNA polymerázy s užitím primerů UEA9, UEA9mod a C2-N-3389 nebo MyFi™ Mix s užitím primerů C2-N-3389 a C1-1709 (viz obrázek 4), sekvence těchto primerů a velikosti očekávaných produktů jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek 4: Oblast nasedání primerů UEA9, UEA9mod, C2-N-3389 a C1-J1709 (podle Simon *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2011).

PCR reakční směs při použití MyFi™ Mix byla připravena dle daného rozpisu, viz tabulka 3, a rozpipetována do 200µl mikroskopů po 24 µl. Do každé reakce byl přidán 1 µl DNA. PCR reakční směs při použití MyTaq™ DNA polymerázy byla připravena dle rozpisu, viz tabulka 4, a rozpipetována do 200µl mikroskopů po 23 µl. Do každé reakce byly přidány 2 µl DNA. Reagencie byly po celou dobu manipulace uchovávány na ledu. Směs byla promíchána a mikroskopů vloženy do přednastaveného termocyklu, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 5. Výsledné PCR produkty byly uchovány při –20 °C.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
C2-N-3389	TCATAAGTTCARTATCATTG	1800	Simon <i>et al.</i> , 1994
C1-J1709	AATTGGWGGWTTYGGAAAYTG		Simon <i>et al.</i> , 2006
C2-N-3389	TCATAAGTTCARTATCATTG	667–677	Simon <i>et al.</i> , 1994
UEA9	GTAAACCTAACATTTTTTCTCAACA		Lunt <i>et al.</i> , 1996
C2-N-3389	TCATAAGTTCARTATCATTG	667–677	Simon <i>et al.</i> , 1994
UEA9mod	GTAAATTTAACATTTTTTCCYCAACA		Bernasconi <i>et al.</i> , 2000

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi při použití MyFi™ Mix.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test [μl]
puf	2x	1x	12,5
voda			10,9
primer 1*	20 pmol · μl ⁻¹	0,25 pmol · μl ⁻¹	0,3
primer 2**	20 pmol · μl ⁻¹	0,25 pmol · μl ⁻¹	0,3
celkem			24
objem reakce			25

*primer 1: C2-N-3389

**primer 2: C1-J-1709

Tabulka 4: Složení PCR reakční směsi při použití MyTaq™ Red DNA polymerázy.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test [μl]
pufr	5x	1x	5
voda			16,8
primer 1*	20 pmol · μl ⁻¹	0,4 pmol · μl ⁻¹	0,5
primer 2**	20 pmol · μl ⁻¹	0,4 pmol · μl ⁻¹	0,5
MyTaqDNA polymeráza	5 U · μl ⁻¹	1 U · reakce ⁻¹	0,2
celkem			23
objem reakce			25

*primer C2-N-3389

**primer UEA9/UEA9mod

Tabulka 5: Podmínky PCR amplifikace.

Primery	Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
C2-N-3389 C1-J1709	počáteční denaturace	95	3	1
	denaturace	95	1	40
	nasedání primerů	43	1	
	elongace	72	1	
	konečná elongace	72	5	
C2-N-3389 UEA9	počáteční denaturace	95	3	1
	denaturace	95	1	40
	nasedání primerů	45	1	
	elongace	72	1	
	konečná elongace	72	5	
C2-N-3389 UEA9mod	počáteční denaturace	95	3	1
	denaturace	95	1	40
	nasedání primerů	50	1	
	elongace	72	1	
	konečná elongace	72	5	

Genotypizace mer

Genotypizace jedinců mery trnkové byla provedena podle Peccoud *et al.* (2013) na základě analýzy vnitřního transkribovaného mezerníku (ITS2) jaderného genu pro ribozomální RNA, s použitím tří trojic primerů, z nichž jeden byl univerzální a dva genotypově specifické. První set primerů se skládal z univerzálního primeru Cp480R a specifických primerů CpA300F a CpB120F; druhý set z univerzálního primeru Cp480R a specifických primerů CpA50F a CpB350F; a třetí set z univerzálního primeru Cp135F a specifických primerů CpA425R a CpB315R. Sekvence užitých primerů a velikosti očekávaných produktů jsou uvedeny v tabulce 6.

Pro jednotlivé genotypizační reakce byla připravena PCR reakční směs (složení viz tabulka 7), která byla následně rozpipetována do 200 µl mikrozkušavek po 24 µl. Do každé reakce byl přidán 1 µl DNA vzorku. Reagencie byly po celou dobu manipulace uchovávány na ledu. Mikrozkušavky s výslednými roztoky o objemu 25 µl byly vloženy do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 8. Výsledné PCR produkty byly uchovány při -20 °C.

Tabulka 6: Seznam primerů použitých pro genotypizaci mery trnkové.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Velikost PCR produktu [bp]		Reference
		skupina A	skupina B	
Cp480R	TACATCCGAGGGTCGGTATC			
CpA300F	GGCCAGTAGTTAAACCGGACT	377	172	
CpB120F	TCCACGGGGTCCGCGATA			
Cp480R	TACATCCGAGGGTCGGTATC			
CpB350F	TTGTGTCTGTGTTTCGAGAGC	421	151	Peccoud <i>et al.</i> , 2013
CpA50F	AATCCAAACCCCGCGATG			
Cp135F	ATACGCGCTCGATCTGACAT			
CpA425R	TCGACTCTCTCGCCTCTCTT	293	177	
CpB315R	TTAACCGCTGGGGCTAGG			

Tabulka 7: Složení PCR reakční směsi.

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetuj 1 test [μl]
pufr	5x	1x	5
voda			17,3
primer 1*	20 pmol · μl ⁻¹	0,4 pmol · μl ⁻¹	0,5
primer 2**	20 pmol · μl ⁻¹	0,4 pmol · μl ⁻¹	0,5
primer 3***	20 pmol · μl ⁻¹	0,4 pmol · μl ⁻¹	0,5
MyTaq DNA polymeráza			0,2
celkem			24
objem reakce			25

*primer Cp480R/Cp135F

**primer CpA300F/CpB350F/CpA425R

***primer CpB120F/CpA50F/CpB315R

Tabulka 8: Podmínky PCR amplifikace.

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	2 min	1
denaturace	94	30 s	
nasedání primerů	56	30 s	40
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	5 min	1

4.4.2 Elektroforetická separace

Elektroforetická separace COI–tRNA^{Leu}–COII ampikonů byla provedena v 1% agarózovém gelu. Zásobní roztok 1% agarózového gelu byl připraven rozpuštěním 3 g agarózy v 300 ml 1x TAE pufru a následným zahřátím v mikrovlnné troubě. Zásobní roztok byl uchován v chladničce při ±4 °C. Zahřátím v mikrovlnné troubě byl zásobní roztok rozpuštěn a poté bylo odebráno 50 ml a přidáno 2,5 μl barviva GelRed Nucleic Acid Stain. Směs byla důkladně promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s vloženými hřebínky. Po zatuhnutí byl gel převrstven 1x TAE puftrem a hřebínky byly vyjmuty. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 μl standardu molekulové váhy GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Bylo smícháno 5 μl PCR produktu s 2 μl 6X DNA Gel Loading Dye a směs byla

poté napipetována do dalších jednotlivých jamek. Separace amplikonů probíhala při 80 V po dobu minimálně 45 min. Po dokončení separace amplikonů byl gel vyhodnocen pomocí UV-transluminátoru a dokumentačního systému G:BOX - Syngene.

Elektroforetická separace amplikonů určených ke genotypizaci jedinců byla provedena ve 2% agarózovém gelu. Zásobní roztok 2% agarózového gelu byl připraven rozpuštěním 6 g agarózy v 300 ml 1x TAE pufru a následným zahřátím v mikrovlnné troubě. Zásobní roztok byl uchován v chladničce při ± 4 °C. Příprava vlastního agarózového gelu a vyhodnocení velikosti amplikonů proběhlo obdobně jako v předchozím případě.

4.4.3 Purifikace PCR produktů

Izolace PCR produktů z gelu pomocí FastGene Gel/PCR Extraction kitu (Geneflow)

Pro izolaci specifických produktů (jejich oddělení od nespecifických) nebo produktů o nízké koncentraci byl použit FastGene Gel/PCR extraction kit. 75 ml 1% agarózového TAE gelu bylo promícháno s 5 μ l ethidium bromidu ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a následně nalito do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel převrstven 1x TAE pufrům. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 μ l standardu molekulové váhy GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, do dalších jamek byl napipetován veškerý PCR produkt smíchaný s 5 μ l 0,1% bromfenolové modři v glycerinu. Elektroforetická separace probíhala 15 minut při 80 V a následně dalších 30 minut při 90 V.

Gel byl umístěn na UV-transluminátor určený k vyřezávání z gelu a každý PCR produkt byl za pomoci sterilního skalpelu vyříznut a umístěn do předem zvážené 1,5ml mikrozkušavky. Vyříznutý gel byl smíchán s 500 μ l GP1 pufru a jemně promíchán. Mikrozkušavky byly inkubovány po dobu 10 min při 55 °C v dry-bloku, s průběžným pomícháváním co 2–3 min, dokud nebyl gel kompletně rozpuštěn. 800 μ l směsi bylo napipetováno do kolonky a centrifugováno při 13 000 rpm po dobu 30 s, filtrát byl následně odstraněn. Pokud bylo rozpuštěné směsi více než 800 μ l tento krok byl zopakován. Následně bylo do kolonky přidáno 600 μ l GP2 pufru a centrifugováno při 13 000 rpm, 30 s, filtrát byl odstraněn. Poté byla kolona centrifugována 2 min při 13 000 rpm a následně umístěna do nové 1,5ml mikrozkušavky. DNA byla eluována napipetováním 30 μ l dH₂O na střed kolonky. Kolonka byla inkubována 2 min při pokojové teplotě a poté byla centrifugována

2 min při 13 000 rpm. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí fluorimetru a následně byla DNA uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Purifikace PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu

Pro izolaci silných, jedinečných, PCR produktů byl použit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Ke 23 μl PCR produktu bylo připipetováno 77 μl destilované vody. NTI pufr byl naředěn v poměru 1:6 (NTI:H₂O). Bylo smícháno 100 μl PCR produktu a 200 μl NTI pufru a celkový objem byl napipetován na povrch kolony umístěné v 2ml jímací mikrozkuhavce. Kolona se vzorkem byla zcentrifugována při 11 000 rpm 1 min. A filtrát byl poté odstraněn. Do kolony bylo přidáno 600 μl NT3 pufru a kolona byla centrifugována 1 min při 11 000 rpm. Filtrát byl odstraněn. Tento krok byl opakován ještě jednou. Následně byla kolona centrifugována 2 min při 11 000 rpm a poté umístěna do nové 1,5ml mikrozkuhavky. DNA byla eluována napipetováním 25 μl dH₂O na střed kolonky. Kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a poté byla centrifugována 1 min při 11 000 rpm. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí fluorimetru a následně byla DNA uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 Sekvenační značení

Sekvenační značení bylo provedeno u 40 vzorků, izolovaných C1-J1709/C2-N-3389 amplikonů, pomocí BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kitu. Vyizolované PCR produkty byly pro sekvenační značení naředěny tak, aby 6 μl roztoku obsahovalo 50 ng DNA.

PCR reakční směs byla připravena smícháním 1 μl BigDye™ pufru, 1 μl BigDye™ Ready Reaction Mix, 2 μl primeru ($1,6\text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a 6 μl naředěného vzorku DNA. Fragmenty byly sekvenovány oboustranně s použitím krajních primerů C1-J1709, C2-N-3389 a vnitřního nově navrženého primeru CPr1055COIr, viz tabulka 9. Reagencie byly po celou dobu manipulace uchovávány na ledu. Reakční směs byla promíchána a mikrozkuhavky vloženy do přednastaveného termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 10. Vzorky byly poté analyzovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti sekvenačního centra Ústavu experimentální botaniky AV ČR, CR-Haná, Olomouc.

Tabulka 9: Seznam primerů použitých pro sekvenační značení.

Název primeru	Sekvence 5'–3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
C2-N-3389	TCATAAGTTCARTATCATTG	1800	Simon <i>et al.</i> , 1994
C1-J1709	AATTGGWGGWTTYGGAAAYTG		Simon <i>et al.</i> , 2006
CPr1055COIr	TCCAAGGAAGTGTGTGGAA	-	<i>tato práce</i>

Tabulka 10: Podmínky sekvenační PCR amplifikace.

Fáze	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3	1
denaturace	95	1	40
nasedání primerů	43	1	
elongace	72	1	
konečná elongace	72	5	1

4.4.5 Bioinformatická analýza

Získaná sekvenční data byla použita pro sestavení finálního sekvenčního contigu pomocí programu MEGA. Následně byly tyto sekvence identifikovány a analyzovány za použití programu BLASTn. Srovnáním se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank byla potvrzena identita sekvencí, vyhledány další podobné sekvence mer a poté byly sekvence seřazeny pomocí ClustalW v mnohočetný alignment. Variabilita jednotlivých sekvencí jedinců byla vyhodnocena pomocí metody p-distance. Následně byla provedena fylogenetická analýza sekvencí pomocí metody Neighbor-Joining a Tamura 3-parametrického modelu, bootstrapping 1000 opakování. Výsledný fylogenetický strom byl sestaven prostřednictvím programu TreeExplorer. Všechny zmíněné analýzy byly provedeny pomocí programu MEGA 11.0 (Tamura *et al.*, 2021).

5 VÝSLEDKY

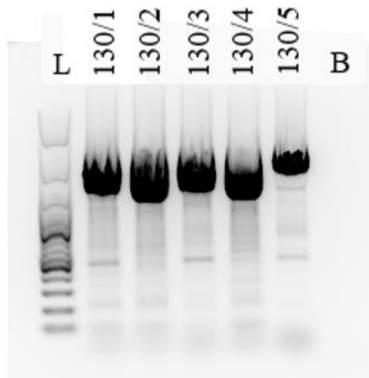
Cílem experimentální části bakalářské práce byla molekulárně genetická charakteristika a genotypizace zástupců druhu mery trnkové (*Cacopsylla pruni*).

5.1 Amplifikace COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA

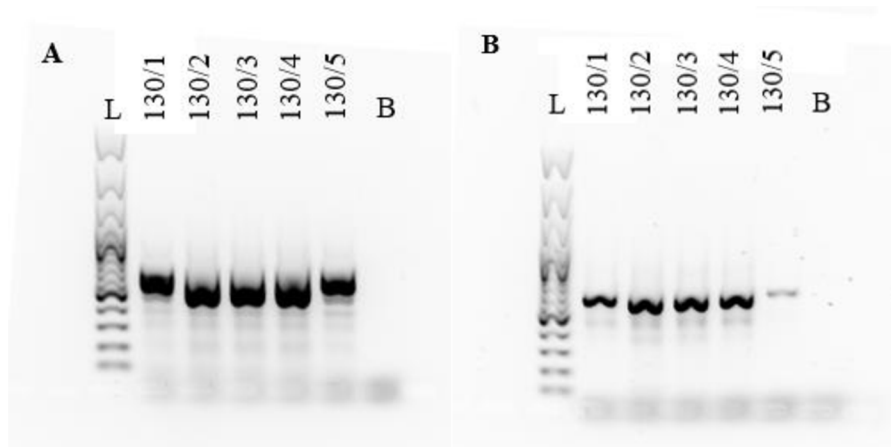
Bylo provedeno ověření primerů dostupných v literatuře vhodných pro amplifikaci cílové COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA mery trnkové (*Cacopsylla pruni*) a optimalizace PCR podmínek. U 5 kontrolních vzorků, označených čísly izolace 130/1–5, byly testovány 3 kombinace primerů, a byly použity dvě odlišné Taq DNA polymerázy. MyFiTM DNA polymeráza byla použita pro amplifikaci kratšího fragmentu, pro kombinaci primerů C2–N–3389/C1–J1709. MyTaqTM Red DNA polymeráza byla použita pro amplifikaci dlouhých fragmentů, pro kombinaci primerů C2–N–3389/UEA9 a C2–N–3389/UEA9mod.

Kombinací MyFiTM DNA polymeráza s primery C2–N–3389/C1–J1709 byly získány očekávané produkty o velikosti cca 1 800 bp, viz obrázek 5. Produkty o očekávané velikosti cca 700 bp byly získány při použití MyTaqTM Red DNA polymerázy a dvou kombinací primerů C2–N–3389/UEA9 anebo C2–N–3389/UEA9mod. Při použití reverzního primeru UEA9 byly získány silnější produkty v porovnání s UEA9mod (viz obrázek 6). Reverzní primer UEA9mod pravděpodobně hůře nasedá na cílovou sekvenci, a proto nebyl v charakterizaci souboru vybraných mer použit.

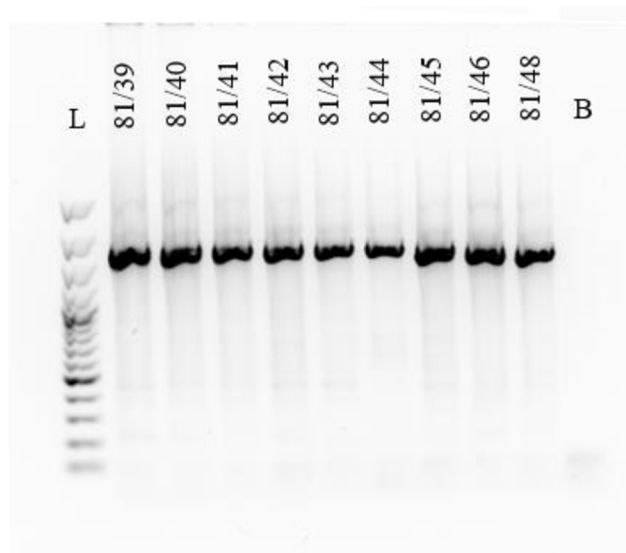
Bylo otestováno celkem 49 vzorků mery trnkové (*Cacopsylla pruni*). Mery byly odchyceny na šesti lokalitách na jižní Moravě (Drahany, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice) v letech 2004, 2006, 2008, 2011, 2012 a 2018. Při amplifikaci genu COI mitochondriální DNA byly u všech testovaných vzorků získány amplikony o očekávané velikosti cca 1 800 bp, viz obrázek 7. Aby byla studovaná oblast pokryta co nejvíce, byly pro amplifikaci COI genu mitochondriální DNA vybrány primery C2–N–3389/C1–J1709 a MyFiTM DNA polymeráza. Ke studiu variability by bylo možné použít i amplikony o velikosti cca 700 bp, které byly získány při amplifikaci pomocí primerů C2–N–3389/UEA9, popřípadě C2–N–3389/UEA9mod a použití MyTaqTM Red DNA polymerázy. Obě tyto kombinace primerů umožňují amplifikaci COI a jejich cílová oblast se z větší části překrývá, a tak byl pro studium genetické variability zvolen delší amplikon získaný s primery C2–N–3389/C1–J1709.



Obrázek 5: Produkty PCR amplifikace COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA s použitím primerů C2-N-3389/ C1-J1709 a MyFi™ DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.
 Legenda: L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola.



Obrázek 6: Produkty PCR amplifikace COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA s použitím primerů C2-N-3389/UEA9 (A) a C2-N-3389/UEA9mod (B) a MyTaq™ Red DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.
 Legenda: L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola.



Obrázek 7: Produkty PCR amplifikace COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA s použitím primerů C2-N-3389/C1-J1709 a MyFiTM DNA polymerázy separované v 1% agarózovém gelu.

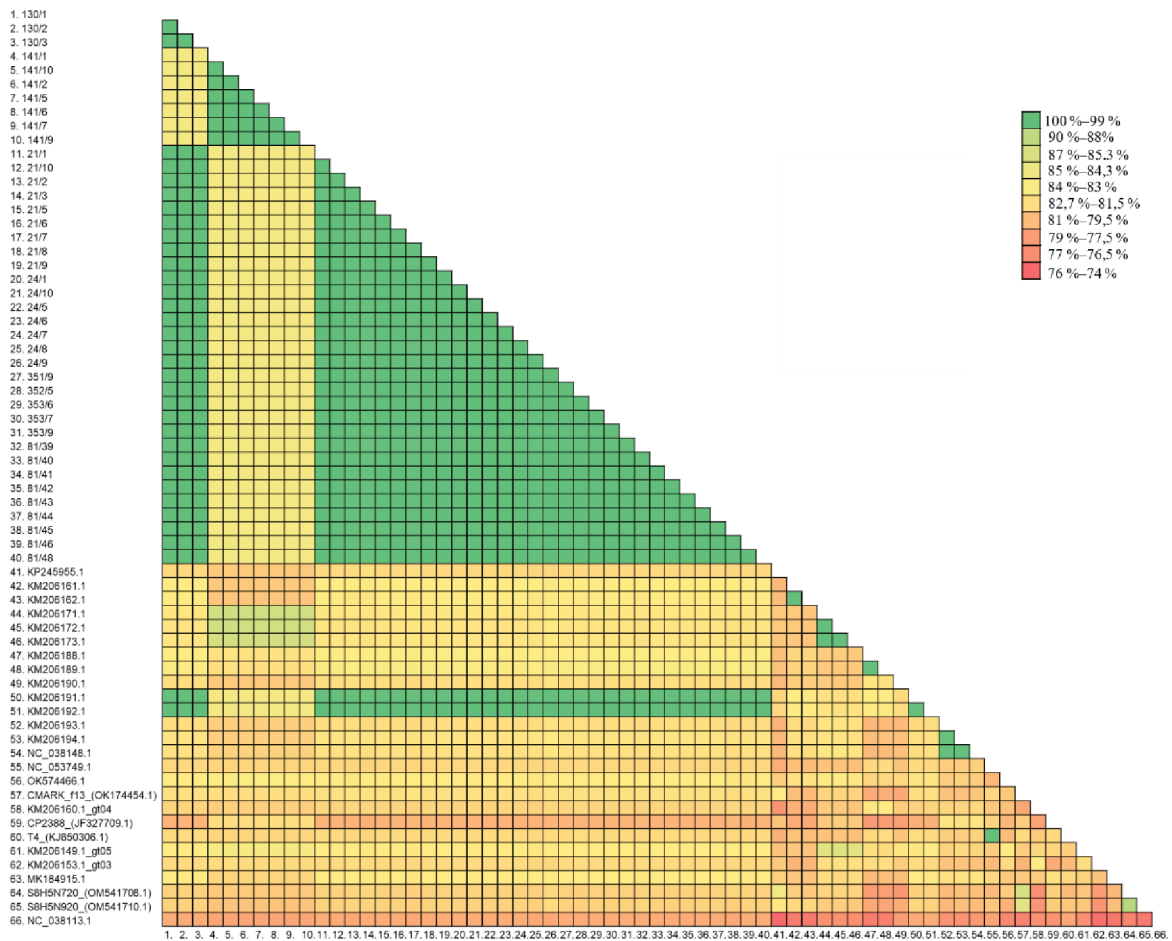
Legenda: L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola.

5.2 Analýza genetické variability COI genu a fylogenetická analýza

Parciální sekvence C2-N-3389/C1-J1709 PCR amplikonů COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti mitochondriální DNA 40 jedinců *Cacopsylla pruni* z šesti lokalit na jižní Moravě (Drahany, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice) o délce 1582–1604 bp byly získány pomocí Sangerova sekvenování. Analyzované sekvence testovaných vzorků byly pomocí BLASTu porovnány se sekvencemi mer dostupných v databázi GenBank. Následně bylo pomocí CLUSTALu provedeno mnohočetné přiřazení. Vzhledem k tomu, že takto dlouhé sekvence *Cacopsylla pruni* nejsou v databázi GenBank veřejně dostupné, byla sekvence rozdělena na dvě části a byla nejdříve provedena analýza variability mitochondriální DNA na základě oblasti COI 9–404 bp sekvence 130/1, viz obrázek 8 a následně byla analyzována oblast COII v pozici 989–1 612 bp stejné sekvence, viz obrázek 10.

Pomocí metody p-distance byla vyhodnocena identita získaných sekvencí v oblasti COI, viz obrázek 8. Bylo zjištěno, že většina sekvencí z analyzovaných jedinců (kromě jedinců označených jako série 141) vykazovala 99–100% identitu se sekvencí genu COI zástupců *Cacopsylla pruni*, izoláty gt02 a gt03, (Acc. No. KM206191.1, KM206192.1) získanými z databáze GenBank. Se sekvencí *C. pruni* izolátu gt01 (Acc. No. KM206190.1), ale vykazovaly sekvence identitu výrazně nižší a to pouze 83–84 %.

Získané sekvence jedinců série 141, vzorky 141/1, 2, 5, 6, 7, 9, 10 vykazovaly s ostatními českými testovanými vzorky 85,3–87% identitu. Porovnáním se sekvencemi získanými v databázi GenBank bylo zjištěno, že vykazují 88–90% identitu se sekvencemi zástupců *Cacopsylla melanoneura* získanými z databáze GenBank, Jedinci z lokality Kalečnick (141/1, 2, 5, 6, 7, 9, 10) vykazovali identitu 85,3–87 % také se zástupci *Cacopsylla pruni* gt02, gt03 (Acc. No. KM206191.1, KM206192.1) získanými z databáze, s *Cacopsylla pruni* gt01 (Acc. No. KM206190.1) z databáze identitu pouze 81,5–82,7 %.



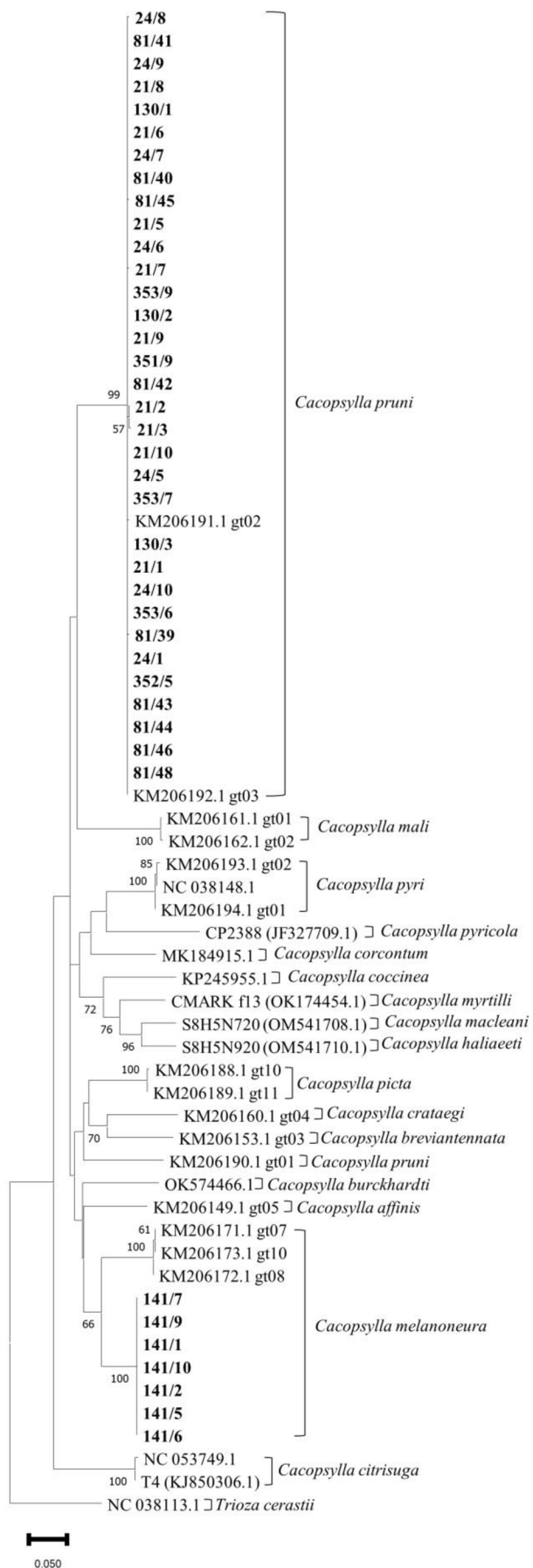
Obrázek 8: P-distance analýza identity parciálních sekvencí COI genu u studovaných zástupců rodu *Cacopsylla*.

Legenda: Analyzovaní jedinci *Cacopsylla pruni* označeni číslem izolace, sekvence mer získané z GenBank označeny pomocí accession number, a názvem izolátu. Míra identity je znázorněna pomocí barevné škály.

Fylogenetické vztahy byly hodnoceny porovnáním s odpovídajícími sekvencemi mer dostupných v databázi GenBank pomocí Neighbor-Joining analýzy. Bylo zjištěno, že analyzované sekvence se vyvětvily do dvou hlavních skupin.

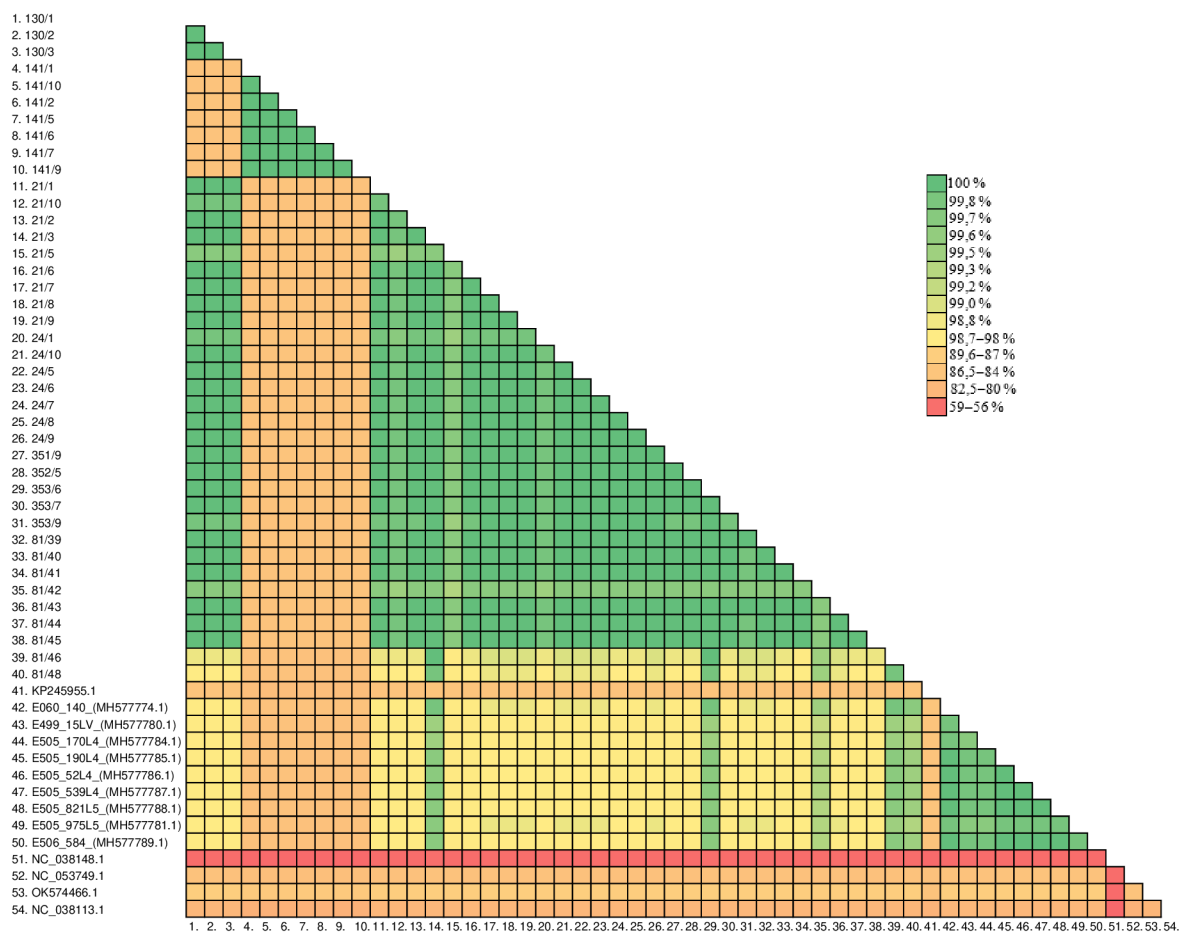
Většina analyzovaných sekvencí jedinců původem z lokalit Dražany, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice se vyvětvila společně se sekvencemi patřícími dle očekávání do jedné statisticky průkazné skupiny, společně se sekvencemi *Cacopsylla pruni* původem z Itálie, Acc. No. KM206191.1, KM206192.1. Jedinci z lokality Kalečnick vytvořili společně s jedinci *C. melanoneura*, sekvence Acc. No. KM206171, KM206172.1, KM206173.1, druhou průkazně odlišnou skupinu, viz obrázek 9.

Zajímavá je lokalizace sekvence *C. pruni* gt01 (Acc. No. KM206190.1), která se vyvětvila mimo větev *C. pruni*, v blízkosti *C. breviantennata*, *C. crataegi* a *C. picta*. Důvodem by mohla být chybná identifikace a zařazení jako *C. pruni*.



Obrázek 9: Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla pruni* a dalších zástupců mer a mer vyskytujících se v ČR zkonstruovaný na základě Neighbor-Joining analýzy parciální sekvence COI genu v pozici 9–404 bp sekvence 130/1 (MEGA 11.0). Sekvence jsou označeny názvem, případně názvem izolátu či genotypu a jejich příslušným accession number z GenBank. Studované sekvence *Cacopsylla pruni* jsou označeny příslušným číslem izolace a zvýrazněny tučně. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Úsečka představuje 0,05 substitucí na pozici.

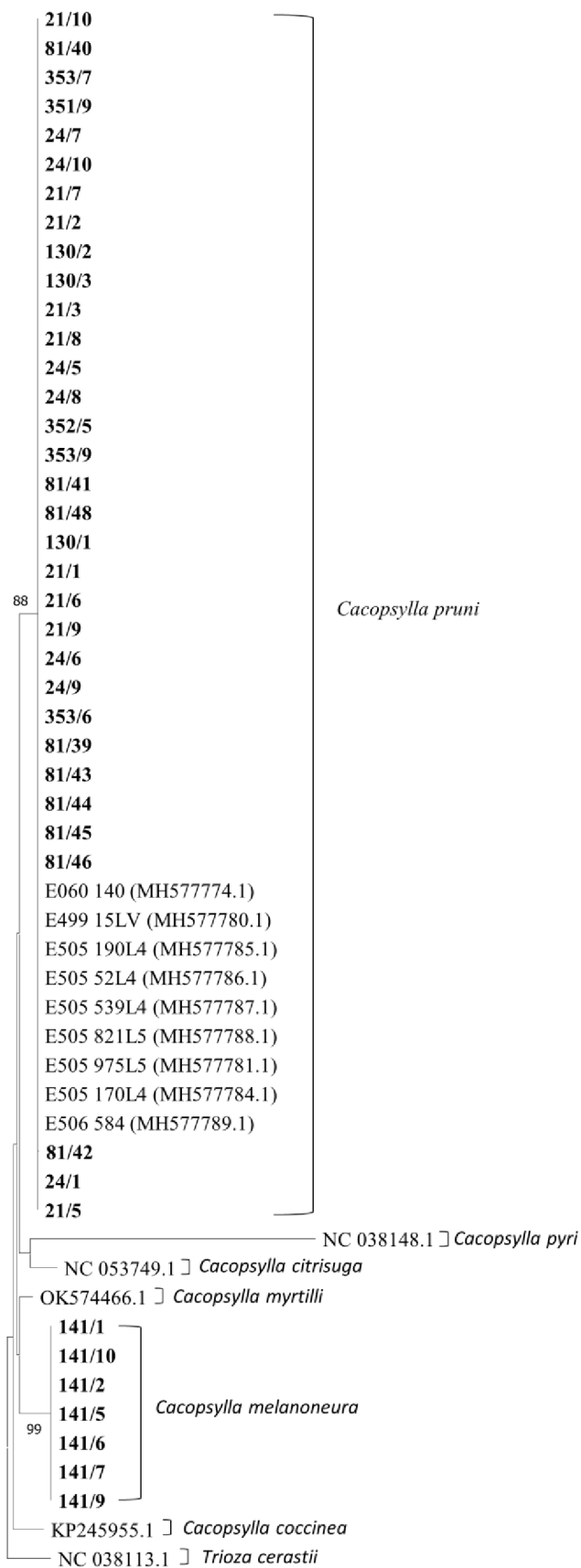
Metodou p-distance byla vyhodnocena identita získaných sekvencí v oblasti COII, viz obrázek 10. Bylo zjištěno, že většina sekvencí z analyzovaných jedinců (kromě jedinců série 141) vykazovala identitu vyšší než 98 %, tedy v rozmezí 98–100 % se sekvencí genu COII zástupců *Cacopsylla pruni* získanými z databáze GenBank. Sekvence jedinců označených jako série 141 vykazují s ostatními analyzovanými českými vzorky i se sekvencemi genu COII *Cacopsylla pruni* z databáze GenBank identitu pouze 84–86,5 %.



Obrázek 10: P-distance analýza identity parciálních sekvencí COII genu u zástupců rodu *Cacopsylla*.

Legenda: Analyzovaní jedinci *Cacopsylla pruni* označeni číslem izolace, sekvence mer získané z GenBank označeny pomocí accession number, sekvence jedinců *Cacopsylla pruni* získané z GenBank jsou označeny příslušným číslem izolátu. Míra identity je znázorněna pomocí barevné škály.

Fylogenetická analýza oblasti COII, pozice 989–1612, potvrdila předchozí zjištění, viz obrázek 11. Analyzované sekvence se vyvětvily do dvou hlavních skupin. Jedna skupina analyzovaných sekvencí, společně se sekvencemi *Cacopsylla pruni* z databáze GenBank původem z Francie (genotypy E060 140, Acc. No. MH577774.1; E499 15LV, Acc. No. MH577780.1; E505 190L4, Acc. No. MH577785.1; E505 52L4, Acc. No. MH577786.1; E505 539L4, Acc. No. MH577787.1; E505 821L5, Acc. No. MH577788.1; E505 975L5, Acc. No. MH577781.1; E505 170L4, Acc. No. MH577784.1; E506 584, Acc. No. MH577789.1), kromě sekvencí série 141, se vyvětvila společně, vytvořil se jeden klastr. Obdobně jako v předchozí analýze se sekvence jedinců série 141 vyvětvily v rámci průkazné, samostatné skupiny v blízkosti *C. myrtili*.

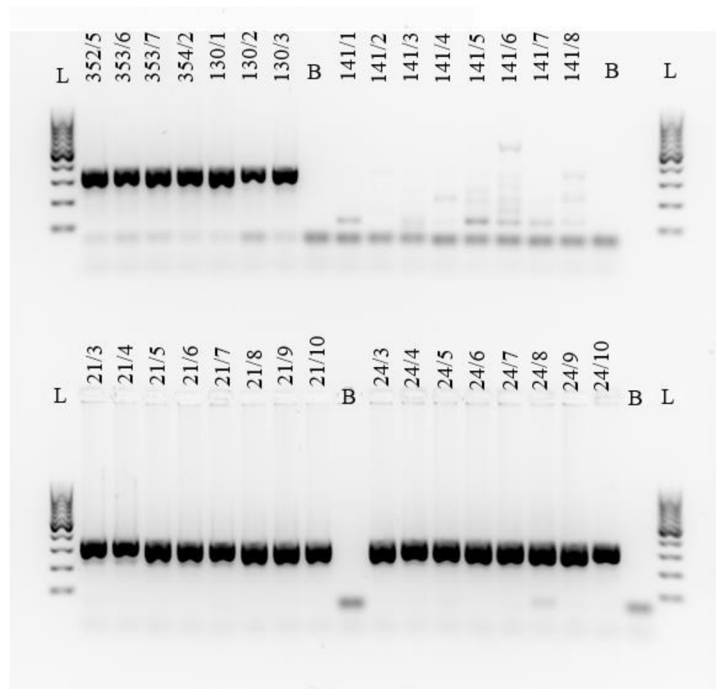


Obrázek 11: Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla pruni* a dalších zástupců mer a mer vyskytujících se v ČR zkonstruovaný na základě Neighbor-Joining analýzy parciální sekvence COII genu v pozici 989–1 612 bp sekvence 130/1 (MEGA 11.0). Sekvence jsou označeny názvem, názvem izolátu a jejich příslušným accession number z GenBank. Studované sekvence *Cacopsylla pruni* jsou označeny příslušným číslem izolace a zvýrazněny tučně. Zobrazeny bootstrap hodnoty ≥ 70 . Úsečka představuje 0,1 substitucí na pozici.

5.3 Genotypizace jedinců pomocí vnitřního transkribovaného mezerníku (ITS2)

Ke zjištění druhové specifity a identifikaci příslušnosti českých populací *C. pruni* do dvou kryptických druhů označených *C. pruni A* a *C. pruni B* byly použity 3 kombinace primerů, a to Cp480R/CpA300F/CpB120F, Cp480R/CpA50F/CpB350F a Cp135F/CpA424R/Cp315R podle Peccoud *et al.*, 2013.

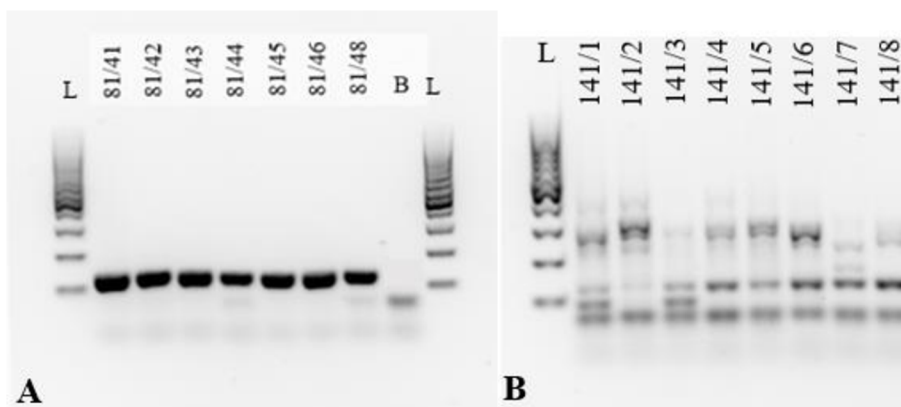
S výše zmíněnými kombinacemi primerů byla provedena PCR amplifikace 49 testovaných vzorků z šesti různých lokalit, a to Drahaný, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice, sběry probíhaly v letech 2004, 2006, 2008, 2011, 2012 a 2018. U 39 testovaných vzorků z lokalit Drahaný, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice byly získány specifické amplikony. Nespecifické produkty byly získány u 10 vzorků z lokality Kalečnick. Při PCR amplifikaci s primery Cp480R/CpA300F/CpB120F byly získány u 39 vzorků jedinců různého původu specifické produkty o velikosti 377 bp, což svědčí o jejich příslušnosti ke genotypu B, viz obrázek 12. Jedinci druhého genotypu (A) zjištěni nebyli. V případě 10 jedinců označených 141 z lokality Kalečnick nebyly získány specifické amplikony, pouze slabé nespecifické produkty různých velikostí, což odpovídá předchozím zjištěním, tj. nejedná se o jedince mery trnkové (*C. pruni*), ale mery skvrnitě (*C. melanoneura*).



Obrázek 12: Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp480R/CpA300F/CpB120F.

Legenda: L: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola

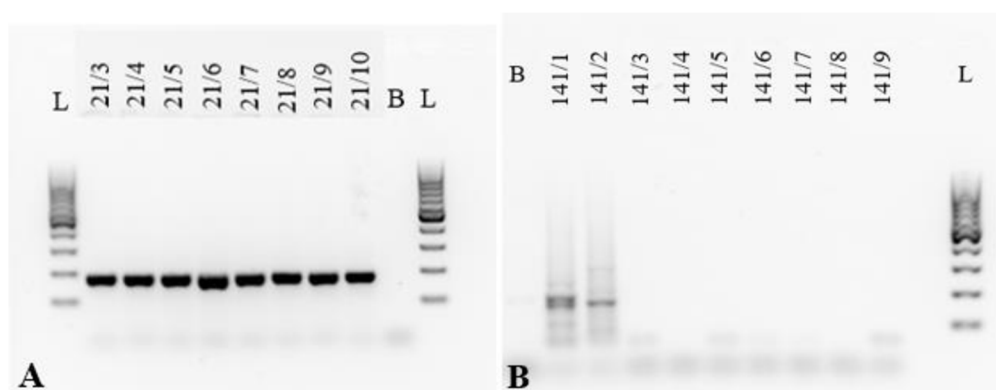
Při použití primerů Cp480R/CpA50F/CpB350F byly u 43 jedinců různého původu a roku sběru (Drahany, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice) získány specifické amplikony. U 39 jedinců různého původu z lokalit Drahany, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice byly získány amplikony o velikosti 151 bp, což svědčí o jejich příslušnosti ke genotypu B (viz obrázek 13A). Jedinci druhého genotypu tedy nebyli zjištěni. U 4 jedinců série 141 z lokality Kalečnick (141/6, 7, 9, 10) byly získány produkty o velikosti cca 421 bp, což by odpovídalo genotypu A, kdyby se jednalo o jedince mery trnkové. Avšak dle předchozího zjištění se nejedná o jedince mery trnkové, ale o jedince mery skvrnité. U 6 jedinců z lokality Kalečnick, vzorků 141/1–5 a 8, nebyly získány specifické amplikony, ale pouze slabé nespecifické produkty různých velikostí, což odpovídá přechozím zjištěním, a tedy, že se jedná o jedince mery skvrnité (viz obrázek 13B).



Obrázek 13: Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp480R/CpA50F/CpB350F.

Legenda: L: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola

Kombinací primerů Cp135F/CpA424R/Cp315R bylo získáno 39 specifických amplikonů a 10 nespecifických produktů. U 39 jedinců různého původu, a to Drahaný, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice byly získány amplikony o velikosti 177 bp, což odpovídá očekávání, že se jedná o jedince genotypu B, viz obrázek 14A. Nebyli zjištěni jedinci *C. pruni* druhého genotypu. Nespecifické produkty byly opět získány u 10 jedinců označených číslem izolace 141 původem z Kalečnicku, viz obrázek 14B.



Obrázek 14: Genotypizace ITS2 pomocí PCR s primery Cp135F/CpA424R/Cp315R.

Legenda: L: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder; dráhy označeny příslušnými čísly izolace vzorků; B: negativní kontrola

Celkem bylo tedy získáno 39 specifických amplikonů u jedinců různého původu a roku sběru. Tito jedinci pocházeli z lokalit Dražany, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice a vzorky byly nasbírány v letech 2004, 2006, 2011, 2012 a 2018. Bylo zjištěno, že tito jedinci náleží ke genotypu B. Žádní jedinci druhého genotypu zjištěni nebyli. V případě 10 jedinců série 141 z lokality Kalečnick a roku sběru 2008 nebyly získány specifické amplikony, ale pouze slabé nespecifické produkty o různé velikosti. Tyto informace odpovídají předchozím zjištěním, tj. nejedná se o jedince mery trnkové, ale o jedince mery skvrnité. Všechny výsledky ukazují, že ve sledovaných oblastech žádné rozdíly zjištěny nebyly.

6 DISKUSE

Fytoplazma evropské žloutenky peckovin je onemocnění, které je rozšířeno především v rámci Francie a Španělska, ale záznamy o jejím výskytu jsou také z oblasti severní Afriky (Llacer *et al.*, 1986, Steffek *et al.*, 2012). Tato fytoplazma způsobuje řadu viditelných příznaků u dřevin rodu *Prunus*, mezi které patří chlorotické svinutí listů, leptonekróza, žloutnutí až červenání listů, případně jejich předčasný opad. Souhrnně jsou všechny tyto symptomy označovány jako evropská žloutenka peckovin. Mezi nejčastější přirozené hostitele řadíme např. meruňku obecnou, broskvoň obecnou či slivoň japonskou, které jsou nejcitlivější na onemocnění ESFY, naopak slivoň švestka má k tomuto onemocnění vysokou toleranci (Hodkinson, 2009, Marcone *et al.*, 2010; Cieslińska, 2011, Bertaccini *et al.*, 2019a). Vzhledem k velkým ekonomickým škodám, které ESFY způsobuje v rámci celé Evropy, je nutno zavádět preventivní a fyto-sanitární opatření, jako je například kontrola vektorů a regulace jejich výskytu. Účinná kontrola vektorů však není často možná a insekticidy nelze kvůli ohrožení kvality plodů bezpečně aplikovat. Dalším problémem je také odolnost vektorů vůči insekticidům, případně neexistence povolených (Kocourek *et al.*, 2013, Bertaccini *et al.*, 2019a). Zabránit přenosu a následnému šíření fytoplazem je velmi obtížné.

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na molekulárně genetickou charakteristiku, detekci a genotypizaci zástupců rodu *Cacopsylla pruni*, vektora fytoplazmy evropské žloutenky peckovin, a jejich bioinformatické analýze a srovnání získaných sekvencí testovaných vzorků se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank.

Bylo otestováno celkem 49 vzorků mery trnkové (*Cacopsylla pruni*). Mery byly odchyceny na šesti lokalitách na jižní Moravě (Drahany, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice) v letech 2004, 2006, 2008, 2011, 2012 a 2018. Při amplifikaci genu COI mitochondriální DNA byly u všech testovaných vzorků získány amplikony o očekávané velikosti cca 1 800 bp. Aby byla studovaná oblast pokryta co nejvíce, byly pro amplifikaci COI genu mitochondriální DNA vybrány primery C2–N–3389/C1–J1709 a MyFiTM DNA polymeráza.

Dle Peccoud *et al.* (2013) se *Cacopsylla pruni* v jižní a střední Evropě vyskytuje jako komplex dvou druhů, který zahrnuje dva kryptické druhy označované jako *Cacopsylla pruni* A s genotypem A a *Cacopsylla pruni* B s genotypem B. U 39 vzorků, u kterých byly získány specifické amplikony, byl stanoven genotyp jedinců testovaných vzorků jako genotyp B. Některé ze vzorků se jevily jako jedinci genotypu A, ale po následném

sekvenování a fylogenetické analýze byli přiřazeni k jinému druhu rodu *Cacopsylla*, a tedy je nelze do genotypizace zahrnout. Zjištění o genotypu testovaných jedinců poskytuje informaci, že populace zástupců rodu *Cacopsylla pruni* v oblasti jižní Moravy vykazuje vysokou homogenitu. Toto zjištění odpovídá informacím uvedeným v literatuře, kdy bylo otestováno 8 jedinců z Velešovic na jižní Moravě a všech 8 jedinců bylo zařazeno do kryptického druhu *Cacopsylla pruni* B s genotypem B.

Analýzou genetické variability mitochondriální DNA v oblasti COI C2–N–3389/C1–J1709 PCR ampliconů se sekvencemi *Cacopsylla pruni* původem z Itálie, které byly získané z databáze GenBank, byla zjištěna identita 99–100 %. Bylo tak zjištěno, že námi testované sekvence jedinců rodu *Cacopsylla pruni*, pocházející z České republiky, se od zástupců *Cacopsylla pruni* pocházejících z Itálie či Francie, nijak výrazně neliší, až na jednu sekvenci *Cacopsylla pruni* původem z Itálie, Acc. No. KM206190.1, která vykazovala identitu pouze 83–84 %. Tento rozdíl může být způsoben chybnou identifikací a zařazením *C. pruni* nebo se jedná o větší genetickou variabilitu, která prozatím nebyla prozkoumána.

Mery jsou si fenotypově velmi podobné a odlišení na základě morfologických znaků, používaných entomology, je velmi obtížné. Vzhledem k těmto skutečnostem může docházet ke špatné identifikaci jedinců a jejich zařazení do nesprávného druhu rodu *Cacopsylla*. Toto se potvrdilo u série jedinců 141, které pochází z oblasti Kalečnicku. Sekvence těchto jedinců vykazovaly 84–87% identitu s jedinci rodu *Cacopsylla pruni*, ale 88–90% identitu s dostupnou sekvencí COI jedinců rodu *Cacopsylla melanoneura*. Pomocí fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že tato série jedinců č. 141 původem z Kalečnicku se vyvětvila do skupiny společně se zástupci rodu *Cacopsylla melanoneura*. Vzhledem k tomuto vyvětvění a zřetelné příslušnosti do fylogenetické větve *Cacopsylla melanoneura* je vysoce pravděpodobné, že byli jedinci chybně identifikováni a že se nejedná o jedince rodu *Cacopsylla pruni*, ale *Cacopsylla melanoneura*. Toto zjištění potvrzuje, že metoda analýzy COI genu je vhodná pro identifikaci sporných jedinců nebo k jejich reklasifikaci. Několikrát došlo na základě analýzy COI genu k reklasifikaci u zástupců jiných druhů, kteří byli podle morfologické analýzy chybně určeni. Např. vzorek byl identifikován jako *Cacopsylla breviantennata*, ale po provedení analýzy genu COI mitochondriální DNA a následným porovnáním analyzované sekvence se sekvencemi *Cacopsylla pyri* z databáze GenBank bylo prokázáno, že analyzovaný vzorek vykazoval 99,7% identitu se sekvencí *Cacopsylla pyri*. Nakonec se tedy jednalo o zástupce rodu *Cacopsylla pyri* a nikoli *Cacopsylla breviantennata*. Špatná entomologická identifikace byla prokázána i u vzorku, který byl

identifikován jako *Cacopsylla picta*, ale po provedení analýzy COI genu a následným porovnáním sekvence se sekvencemi v databázi GenBank bylo zjištěno, že analyzovaný vzorek je totožný se sekvencí *Cacopsylla melanoneura* (Oettl *et* Schlink, 2015). Metoda analýzy COI genu pro reklasifikaci sporných jedinců byla použita k analýze chybně identifikovaných druhů *Cacopsylla* uvedených v databázi GenBank. Bylo zjištěno, že např. sekvence *C. pyricola* původem z Koreje uvedená v databázi GenBank, Acc. No. JF327670.1, vykazovala významné odchylky od vzorků *C. pyricola* z Evropy, ale od *C. jukyngi* se výrazně nelišila (Kang *et al.*, 2012).

7 ZÁVĚR

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*' neboli fytoplasma evropské žloutenky peckovin je onemocnění, které u některých zástupců rodu *Prunus* způsobuje řadu viditelných příznaků a vede k významným ekonomickým škodám při produkci ovoce ve střední a jižní Evropě. Mezi způsoby šíření patří přenos vektory, v tomto případě se jedná o zástupce druhu *Cacopsylla pruni* (mera trnková). Samotná identifikace vektorových mer na základě morfologických vlastností je velmi obtížná, a proto jsou vyvíjeny molekulární metody detekce, jako je například metoda založená na analýze COI genu mitochondriální DNA, které usnadňují identifikaci neznámých jedinců, sporných jedinců nebo reklasifikaci jedinců.

V experimentální části bakalářské práce byla provedena molekulárně genetická charakteristika mery trnkové (*Cacopsylla pruni*) na základě COI-tRNA^{Leu}-COII oblasti. Celkem bylo otestováno 49 vzorků jedinců mer *Cacopsylla pruni* pocházejících z šesti lokalit v oblasti jižní Moravy (Drahany, Kalečnick, Lednice, Olšany, Valtice a Velké Bílovice) z různých let (2004, 2006, 2008, 2011, 2012 a 2018).

Pomocí PCR s primery C2-N-3389/C1-J1709 a Sangerova sekvenování byly u 40 jedinců získány sekvence o délce cca 1 800 bp pokrývající COI-tRNA^{Leu}-COII oblast mitochondriální DNA. Sekvence vykazovaly vysokou homogenitu a nejvyšší podobnost, 99–100 % se sekvencemi *C. pruni* (Acc. No. KM206191.1, KM206192.1), které pocházejí z Itálie a byly získány z databáze GenBank. Na základě 16S rDNA genotypizace byli všichni studovaní jedinci *C. pruni* původem z jižní Moravy zařazeni do stejného genotypu *C. pruni*, a to genotypu B. U 7 jedinců původem z lokality Kalečnick byla prokázána chybná identifikace. Získané sekvence vykazovaly pouze 84–87% identitu s odpovídajícími sekvencemi *C. pruni*, ale 88–90% identitu se sekvencemi COI *C. melanoneura*, tito jedinci byli s největší pravděpodobností chybně identifikováni a nejednalo se o *C. pruni*, ale o *C. melanoneura*.

Fylogenetická analýza parciálních sekvencí COI a COII potvrdila předchozí zjištění. Získané sekvence se vyvětvily do dvou samostatných větví. Topologie stromů byla v případě obou částí genu stejná a potvrdila vysokou podobnost s doposud popsány COI geny *C. pruni* a nutnost reklasifikace jedinců lokality Kalečnick. Nebyly nalezeny rozdíly mezi jedinci *C. pruni* z různých lokalit a z různých let, ve kterých byli odchyceni. Zároveň byla potvrzena vhodnost použití sledované oblasti genu pro cytochromoxidázu pro detekci, identifikaci, reklasifikaci a genotypizaci mer.

8 LITERATURA

- Alma, A., Tedeschi, R., Lessio, F., Picciau, L., Gonella, E., & Ferracini, C. (2015). Insect vectors of plant pathogenic Mollicutes in the Euro-Mediterranean region. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5, 53-73.
- Andersen, M. T., Liefting, L. W., Havukkala, I., & Beever, R. E. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' reveals genome plasticity. *BMC genomics*, 14, 529.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3682–3696.
- Balakishiyeva G, Danet JL, Qurbanov M, Mamedov A, Kheyr-Pour A, Foissac X (2010) First report of phytoplasma infections in several temperate fruit trees and vegetables. *Journal of Plant Pathology* 92(4, Suppl.), S4.115.
- Ben Khalifa M, Aldaghi M, Hacheche H, Kummert J, Marrakchi M, Fakhfakh H (2011) First report of 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*' infecting apricots in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 93(2), 517-519.
- Bernasconi, M. V., J. Pawlowski, C. Valsangiacomo, J.-C. Piffaretti, and P. I. Ward. 2000a. Phylogeny of the Scathophagidae (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16:308–315.
- Bertaccini A. (2019c) The phytoplasma classification between 'Candidatus species' provisional status and ribosomal grouping system. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1), 1-2.
- Bertaccini, A., Fiore, N., Zamorano, A., Tiwari, A. K., & Rao, G. P. (2019b). *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - III*.
- Bertaccini, A., Weintraub, P. G., Rao, G. P., & Mori, N. (Eds.). (2019a). *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II*.
- Bertaccini, Assunta & Arocha-Rosete, Yaima & Contaldo, Nicoletta & Duduk, Bojan & Fiore, Nicola & Montano, Helena & Kube, Michael & Kuo, Chih-Horng & Martini, Marta & Oshima, Kenro & Quagliano, Fabio & Schneider, Bernd & Wei, Wei & Zamorano, Alan. (2022). Revision of the 'Candidatus *Phytoplasma*' species

- description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 72.
- Bertaccini, Assunta & Duduk, Bojan & Paltrinieri, Samanta & Contaldo, Nicoletta. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*. 05. 1763-1788.
- Bertin S., Bosco D. (2013) Molecular Identification of Phytoplasma Vector Species. In: Dickinson M., Hodgetts J. (eds) *Phytoplasma. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 938. Humana Press, Totowa, NJ.
- Cao, Y., Sun, G., Zhai, X., Xu, P., Ma, L., Deng, M., Zhao, Z., Yang, H., Dong, Y., Shang, Z., Lv, Y., Yan, L., Liu, H., Cao, X., Li, B., Wang, Z., Zhao, X., Yu, H., Wang, F., Ma, W., ... Fan, G. (2021). Genomic insights into the fast growth of paulownias and the formation of Paulownia witches' broom. *Molecular plant*, 14(10), 1668–1682.
- Carraro, L., Ferrini, F., Labonne, G., Ermacora, P., & Loi, N. (2004). Seasonal Infectivity Of *Cacopsylla Pruni*, Vector Of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma. *Annals Of Applied Biology*, 144(2), 191–195.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., & Refatti, E. (1998). Transmission Of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma By *Cacopsylla Pruni*. *Journal Of Plant Pathology*, 80(3), 233–239.
- Cieślińska, Mirosława. (2011). European Stone Fruit Yellows Disease and Its Causal Agent ‘*Candidatus Phytoplasma Prunorum*’. *Journal of Plant Protection Research*. 51.
- Coetzee, B., Douglas-Smit, N., Maree, H. J., Burger, J. T., Krüger, K., & Pietersen, G. (2019). Draft Genome Sequence of a "*Candidatus Phytoplasma asteris*"-Related Strain (Aster Yellows, Subgroup 16SrI-B) from South Africa. *Microbiology resource announcements*, 8(17), e00148-19.
- Contaldo N, Stepanović J, Pacini F, Bertaccini A, Duduk B. Molecular Variability and Host Distribution of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ Strains from Different Geographic Origins. *Microorganisms*. 2021; 9(12):2530.
- Danet, J. L., Balakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Laviña, A., Batlle, A., Križanac, I., Škorić, D., Ermacora, P., Serçe, Ç. U., Çağlayan, K., Jarausch, W., & Foissac, X. (2011). Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 2), 438–450.

- Davies DL, Adams AN (2000) European stone fruit yellows phytoplasmas associated with a decline disease of apricot in Southern England. *Plant Pathology* 49, 635-639.
- Delic D, Martini M, Ermacora P, Carraro L, Myrta A (2005) First report of fruit tree phytoplasma and their psyllid vectors in Bosnia and Herzegovina. *Journal of Plant Pathology* 87(2), p 150.
- Delic, Duska. (2012). Polymerase Chain Reaction for Phytoplasmas Detection.
- Devonshire, B. J. (2012). Visualization of Phytoplasmas Using Electron Microscopy. *Phytoplasma*, 123–138.
- 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. *Japanese Journal Of Phytopathology*, 33(4), 259–266.
- Favali, M. A., Musetti, R., Benvenuti, S., Bianchi, A., & Pressacco, L. (2004). *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma*, 223(1), 45–51.
- Fialová, R., Navrátil, M., Válková, P., Lauterer, P., Kocourek, F., & Poncarová-Voráčková, Z. (2004). Epidemiology Of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma In The Czech Republic. *Acta Horticulturae*, (657), 483–487.
- Firrao, G., Gibb, K. & Streten, C. (2005). Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology* 87, 249–263.
- Galetto, Luciana & Marzachi, Cristina & Marques, Rodrigo & Graziano, Carlo & Bosco, Domenico. (2011). Effects of temperature and CO 2 on phytoplasma multiplication pattern in vector and plant. *Bulletin of Insectology*. 64.
- Gibson, J. F., Kelso, S., Jackson, M. D., Kits, J. H., Miranda, G. F. G., & Skevington, J. H. (2011). Diptera-Specific Polymerase Chain Reaction Amplification Primers of Use in Molecular Phylogenetic Research. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5), 976–997.
- Hashemi-Tameh M, Bahar M, Zirak L (2014) Molecular characterization of phytoplasmas related to apple proliferation and Aster yellows groups associated with pear decline symptoms in Iran. *Journal of Phytopathology* 16(10), 627-702.
- Hodgetts, Jennifer et al. "Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* vol. 58,Pt 8 (2008): 1826-37.

- Hodkinson, Ian. (2009). Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): A global synthesis. *Journal of Natural History - J NATUR HIST.* 43. 65-179.
- Hogenhout, S. A. (2009). Plant Pathogens, Minor (Phytoplasmas). *Encyclopedia of Microbiology*, 678–688.
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, e., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular plant pathology*, 9(4), 403–423.
- Huang, C. T., Cho, S. T., Lin, Y. C., Tan, C. M., Chiu, Y. C., Yang, J. Y., & Kuo, C. H. (2022). Comparative Genome Analysis of 'Candidatus Phytoplasma luffae' Reveals the Influential Roles of Potential Mobile Units in Phytoplasma Evolution. *Frontiers in microbiology*, 13, 773608.
- Chen, W., Li, Y., Wang, Q., Wang, N., & Wu, Y. (2014). Comparative genome analysis of wheat blue dwarf phytoplasma, an obligate pathogen that causes wheat blue dwarf disease in China. *PloS one*, 9(5), e96436.
- Cho, S. T., Lin, C. P., & Kuo, C. H. (2019). Genomic Characterization of the Periwinkle Leaf Yellowing (PLY) Phytoplasmas in Taiwan. *Frontiers in microbiology*, 10, 2194.
- Cho, S. T., Zwolińska, A., Huang, W., Wouters, R., Mugford, S. T., Hogenhout, S. A., & Kuo, C. H. (2020). Complete Genome Sequence of "Candidatus Phytoplasma asteris" RP166, a Plant Pathogen Associated with Rapeseed Phyllody Disease in Poland. *Microbiology resource announcements*, 9(35), e00760-20.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526–535.
- International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes (1993) Minutes of the Interim Meetings, 1 and 2 August, 1992, Ames, Iowa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 394–397.
- International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes (1997) Minutes of the interim meetings, 12 and 18 July 1996, Orlando, Florida, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 911–914.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004) 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.

- Kang A. R., Baek J. Y., Lee S. H., Cho Y. S., Kim W. S., Han Y. S., Kim I. S. (2012) Geographic homogeneity and high gene flow of the pear psylla, *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae), detected by mitochondrial COI gene and nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2. *Animal Cells and Systems* 16: 145–153.
- Kiss, T., Nečas, T., Nečasová, J., Wolf, J. & Ondrášek, I. (2019). Kvantifikace fytoplazem ovocných dřevin skupiny 16SrX ('Candidatus *Phytoplasma prunorum*', 'Candidatus *Phytoplasma mali*' a 'Candidatus *Phytoplasma pyri*') pomocí real-time PCR. Mendelova univerzita v Brně, 80 s. ISBN 978-80-7509-632-6.
- Kocourek, František, Vladan Falta, Jitka Stará, Kamil Holý, Tereza Horská a Radek Vávra. Minimalizace rizik pesticidů v integrované produkci jaderovin: Certifikovaná metodika. Výzkumný Ústav Rostlinné Výroby, 2013. ISBN 978-80-7427-145-8.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus *Phytoplasma mali*'. *BMC genomics*, 9, 306.
- Lebsky, V & Poghosyan, Arevik. (2014). Scanning electron microscopy detection of phytoplasmas and other phloem limiting pathogens associated with emerging diseases of plants.
- Lee, I.-M., Davis, R. E., & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). *Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 221–255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., & Bartoszyk, I. M. (1998). Revised Classification Scheme of Phytoplasmas based on RFLP Analyses of 16S rRNA and Ribosomal Protein Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4), 1153–1169.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., & Seemüller, E. (1999). Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(1), 59–68.
- Liefting, L. W., Shaw, M. & Kirkpatrick, B. C. (2004). Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Microbiology* 150, 1809–1817.
- Llacer, G.; Medina, V.; Archelos, D. (1986) *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 12 (2), 181-207.
- Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., & An Chen, T. (2002). Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology*, 108(1), 81–86.

- Lorenz, K. H.; Dosba, F.; Poggi-Pollini, C.; Llacer, G.; Seemuller, E. (1994) *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101 (6), 567-575.
- Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M., & Hewlitt, O. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3), 153–165.
- Maramorosch, Karl. (2011). Historical reminiscences of phytoplasma discovery. *Bulletin of Insectology*. 64.
- Marcone, C. (2014). Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 199–221.
- Marcone, Carmine & Jarausch, Barbara & Jarausch, W.. (2010). Candidatus *Phytoplasma prunorum*, the causal agent Of European stone fruit yellows: An overview. *Journal of Plant Pathology*. 92.
- Martini, Marta & Lee, I.-M & Bottner, K & Zhao, Yurong & Botti, Simona & Bertaccini, A & Harrison, Nigel & Carraro, L & Marcone, Carmine & Khan, A & Osler, R.. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 57. 2037-51.
- Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J. M., & Oropeza, C. (2003). Changes in Carbohydrate Metabolism in Coconut Palms Infected with the Lethal Yellowing Phytoplasma. *Phytopathology*, 93(8), 976–981.
- Mehle N, Ravnkar M, Seljak G, Knapic V, Dermastia M (2011) The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes* 1(2), 1-12.
- Munyaneza, J. E., & Henne, D. C. (2013). Leafhopper and Psyllid Pests of Potato. *Insect Pests of Potato*, 65–102.
- Myrta A, Martini M, Susuri L, Susuri HS, Carraro L (2006) First report of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in Kosovo. *Journal of Plant Pathology* 88(1), 121-125.
- Myrta, A.; Ermacora, P.; Stamo, B.; Osler, R. (2003) First report of phytoplasma infections in fruit trees and grapevine in Albania. *Journal of Plant Pathology*, 85(1), p 64.
- Namba S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 95(7), 401–418.
- Navratil M, Valova P, Fialova R, Franova J, Vorackova Z, Karesova R (1998) Occurrence of fruit tree phytoplasmas in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* 472, 649-653.

- Navrátil M., Příbylová J., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Špak J., Kubelková D., Petrzik K., Karešová R., Špaková V. (2007). Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*. *Bulletin of Insectology* 60, 123-124.
- Navrátil M., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Duchoslav M., Petrzik K. (2005). Detectability of European stone fruit yellows phytoplasma using PCR with ribosomal primers. *Phytopathologica Polonica* 35, 117-120.
- Navrátil, M., Fialová, R. (Eds.): *Fytoplazmy - významné patogeny rostlin*. Česká fytopatologická společnost a Univerzita Palackého v Olomouci, 2008.
- Necas, Tomas & Ondrášek, I. & Krška, Boris. (2015). ‘ Candidatus Phytoplasma prunorum’ – a pathogen spreading uncontrollably in apricot orchards in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*. 1105. 131-136.
- Nečas T, Mašková V, Krška B (2008) The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. *Acta Horticulturae* 781, 443–448.
- Nejat, Naghmeh & Vadamalai, Ganesan. (2013). Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: Past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 120. 16-25.
- Nipah JO, Jones P, Hodgetts J, Dickinson M (2007) Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology* 60, 385–386.
- Ntushelo, K. (2010). Molecular Properties of Texas Phoenix Decline Phytoplasma, a Subgroup 16sriv-d Strain Associated with Lethal Diseases of Sabal Palmetto and Other Palms in Florida. Thesis (Ph.D.). University of Florida.
- Oettl, S., & Schlink, K. (2015). Molecular Identification of Two Vector Species, *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae), of Apple Proliferation Disease and Further Common Psyllids of Northern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 108(5), 2174–2183.
- Olivier T, Kummert J and Steyer S (2004) First detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) in Belgium. *Acta Horticulturae* 657, 519-522.
- Orlovskis, Z., Canale, M. C., Haryono, M., Lopes, J., Kuo, C. H., & Hogenhout, S. A. (2017). A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of botany*, 119(5), 869–884.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., & Namba, S. (2004). Reductive evolution

- suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature genetics*, 36(1), 27–29.
- Oshima, K., Maejima, K., & Namba, S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in microbiology*, 4, 230.
- Peccoud J, Labonne G, Sauvion N (2013) Molecular Test to Assign Individuals within the *Cacopsylla pruni* Complex. *PLoS ONE* 8(8): e72454.
- Ploaie, P.G. (1980) Experimental evidence of the presence of mycoplasma in apricot with decline symptoms and their role in apricot apoplexy. *Analele Institutului de Cercetari pentru Protectia Plantelor* 16, 29-34.
- R.E. Davis, E.L. Dally, A. Bertaccini, R. Credi, I.M. Lee, R. Osler, L. Carraro and M. Barba (1992). Cloned DNA probes for specific detection of Italian periwinkle virescence mycoplasma-like organism (MLO) and investigation of genetic relatedness with other MLOs. *Phytopathologia mediterranea*, 31, 5–12.
- Robert, Steffek & Follak, Swen & Sauvion, Nicolas & Labonne, G. & Macleod, Alan. (2012). Distribution of 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*' and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: A review. *EPPO Bulletin*. 42.
- Sasikala, & Rajeev, G. & Vijayamma Ramakrishnan Nair, Prakash & Amit, S.. (2011). Modified protocol of ELISA for rapid detection of coconut root (wilt) disease. *Journal of Plantation Crops*. 38. 16-19.
- Seemüller, E. & Marcone, Carmine & Lauer, U. & Ragozzino, A. & Göschl, M. & Bundesanstalt, Biologische. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80 (1), 3–26.
- Seemüller, E. (1976). Investigations To Demonstrate Mycoplasma-like Organisms In Diseased Plants By Fluorescence Microscopy. *Acta Hort.* 67, 109-112.
- 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(4): 1217-1226.
- Seemüller, E.; Foster, J. A. (1995) *Compendium of stone fruit diseases* [Ed. by Ogawa, J.M. et al.], 59-60. APS Press, St Paul, USA.
- Schaff, D., Lee, I.-M., & Davis, R. E. (1992). Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186(3), 1503–1509.

- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651–701.
- Simon, C., T. R. Buckley, F. Frati, J. B. Stewart, and A. T. Beckenbach. 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 545–579.
- Steffeck R, Follak S, Sauvion N, Labonne G, MacLeod A (2012) Distribution of ‘Candidatus *Phytoplasma prunorum*’ and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: a review. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 42(2), 191-202.
- Streten, C. & Gibb, K. S. (2005). Genetic variation in *Candidatus Phytoplasma australiense*. *Journal of Plant Pathology* 54, 8–14.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021): MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Tan, C. M., Lin, Y. C., Li, J. R., Chien, Y. Y., Wang, C. J., Chou, L., Wang, C. W., Chiu, Y. C., Kuo, C. H., & Yang, J. Y. (2021). Accelerating Complete *Phytoplasma* Genome Assembly by Immunoprecipitation-Based Enrichment and MinION-Based DNA Sequencing for Comparative Analyses. *Frontiers in microbiology*, 12, 766221.
- 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(3), 265–273.
- Topchiiska M, Marcone C, Seemüller E(2000) Detection of pear decline and European stone fruit yellows in Bulgaria. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107(6), 658-663.
- Town, J. R., Wist, T., Perez-Lopez, E., Olivier, C. Y., & Dumonceaux, T. J. (2018). Genome Sequence of a Plant-Pathogenic Bacterium, "*Candidatus Phytoplasma asteris*" Strain TW1. *Microbiology resource announcements*, 7(12), e01109-18.
- Ulubaş Serçe Ç, Gazel M, Çağlayan K, Baş, Son L (2006) *Phytoplasma* disease of fruit trees in germplasm and commercial orchards in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 88(2), 179-185.

- Valasevich N, Schneider B (2016) Detection, identification and molecular diversity of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' in Belarus. *Journal of Plant Pathology* 98(3), 625-629.
- Wang, J., Song, L., Jiao, Q., Yang, S., Gao, R., Lu, X., & Zhou, G. (2018). Comparative genome analysis of jujube witches'-broom Phytoplasma, an obligate pathogen that causes jujube witches'-broom disease. *BMC genomics*, 19(1), 689.