Univerzita Palackého v Olomouci

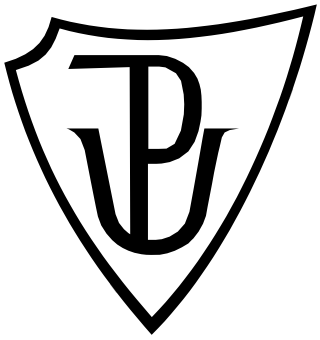
Bakalářská práce

Olomouc 2023 **Kristýna Daniela Kruťová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ - významný patogen jabloní a její vektoři

Bakalářská práce

Kristýna Daniela Kruťová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

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:	Kristýna Daniela KRUŤOVÁ
Osobní číslo:	R19840
Studijní program:	81501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Téma práce:	'*Candidatus* Phytoplasma mali' - významný patogen jabloní a její vektoři
Zadávající katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Literární rešerše zaměřená na biologickou a molekulárně genetickou charakteristiku fytoplazmy *'Candidatus* Phytoplasma mali' vybrané fytoplazmy ovocných dřevin a jejích významných vektorů.

Molekulární detekce a genotypizace zástupců r. *Cacopsylla picta* 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. In: Dickinson M., Hodgetts J. (eds): Phytoplasma. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Humana Press, Totowa, NJ. 938.

Danet J. L. et al. (2011): Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. Microbiology 157(2): 438-450.

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.

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): 2174-83.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 24. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 25. března 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Kristýna Daniela Kruťová

Název práce: ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ - významný patogen jabloní a její vektoři

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2023

Klíčová slova: ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, metoda PCR, *Cacopsylla picta*

Počet stran: 46

Jazyk: český

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na charakteristiku fytoplazmy proliferace jabloně (ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ) a jejího vektora, meru *Cacopsylla picta*.

Teoretická část práce je nejprve zaměřena na charakteristiku fytoplazem, jejich klasifikaci a metody detekce. Následně je zde popsána biologická a molekulárně genetická charakteristika fytoplazmy ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ a jejích hlavních přenašečů *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura*.

V experimentální části bakalářské práce bylo pracováno se 45 vzorky mer *Cacopsylla picta* pocházejícími ze čtyř lokalit na Moravě. Pomocí Sangerova sekvenování CPF4/CPR4 PCR amplikonů byly získány parciální sekvence COI u 26 jedinců *Cacopsylla picta* o délce cca 700 bp. Následným vyhodnocením studovaných vzorků pomocí p-distance metody byla u většiny vzorků zjištěna 99-100% identita COI nukleotidové sekvence se sekvencemi *Cacopsylla picta* původem z Itálie získanými z databáze GenBank. Pomocí fylogenetické analýzy byla prokázána homogenita genotypů studovaných jedinců bez ohledu na jejich geografický původ, kteří se rozdělili do dvou fylogenetických skupin.

Bibliographical identification

Author´s name and surname: Kristýna Daniela Kruťová

Title: ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ - important pathogen of apple 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: 2023

Keywords: ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, PCR method, *Cacopsylla picta*

Number of pages: 46

Language: Czech

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the characterization of the proliferating phytoplasma of apple (ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ) and its vector, the psyllid *Cacopsylla picta*.

The theoretical part of the thesis is first focuses on the characteristics of phytoplasmas, their classification and detection methods. Subsequently, the biological and molecular genetic characteristics of the phytoplasma ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ and its main vectors *Cacopsylla picta* and *Cacopsylla melanoneura*, are described.

In the experimental part of the bachelor thesis, 45 samples of *Cacopsylla picta* were collected from four sites in Moravia. Using Sanger sequencing of CPF4/CPR4 PCR amplicons, partial COI sequences were obtained for 26 individuals of *Cacopsylla picta* with lenght of about 700 bp. Evaluation of the samples studied using the p-distance method showed 99-100% identity of the COI nucleotide sequences with *Cacopsylla picta* sequences from Italy obtained from the GenBank database. Phylogenetic analysis confirmed the homogeneity of genotypes of the individuals studied, regardless of their geographical origin and it allowed their discrimination into two main phylogenetic clusters.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph. D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne …… ……

Kristýna Daniela Kruťová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Šafářové Ph. D. za její odborné a trpělivé vedení, které mi poskytla při psaní bakalářské práce a za její cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě ve studiu podporuje.

OBSAH

1 ÚVOD 1
2 CÍLE PRÁCE 2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 3
3.1 Charakteristika fytoplazem 3
3.1.1 Klasifikace fytoplazem 3
3.1.2 Genom fytoplazem 4
3.2 Metody detekce fytoplazem 4
3.3 ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ - fytoplazma proliferace jabloně 6
3.3.1 Příznaky choroby způsobené fytoplazmou proliferace jabloně 6
3.3.2 Ekonomický význam fytoplazmy proliferace jabloně 7
3.3.3 Okruh hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně 8
3.3.4 Geografické rozšíření fytoplazmy proliferace jabloně 10
3.4 Genetická charakteristika fytoplazmy proliferace jabloně 10
3.5 Způsob přenosu a šíření fytoplazmy proliferace jabloně 11
3.5.1 Mery *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura* 12
3.5.2 *Fieberiella florii* 13
3.6 Interakce hostitel-patogen 13
3.7 Molekulární determinace vektorů fytoplazem 14
3.8 Fytoplazma proliferace jabloně v České republice 15
4. MATERIÁL A METODY 16
4.1 Biologický materiál 16
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky 16
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení 17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy 17
4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) 17
4.4.2 Elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu 19
4.4.3 Pročištění PCR produktů 20
4.4.4 Sangerovo sekvenování 20
4.4.5 Bioinformatická analýza sekvencí 21
5. VÝSLEDKY 22
5.1 Amplifikace oblasti COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA 22
5.2 Fylogenetická analýza a analýza genetické variability COI fragmentu 25
6. DISKUSE 29
7. ZÁVĚR 32
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 33

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AP Apple Proliferation Phytoplasma (fytoplazma proliferace jabloně)

COI Cytochrom oxidáza kódující podjednotku I

PCR Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

RFLP Restriction fragment length polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

SSCP Single-strand conformation polymorphism (polymorfismus konformace jednovláknové DNA)

LAMP Loop-mediated isothermal amplification (izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) C1-J1709/HCO2198 a (B) CPF4/CPR4 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase.

Obrázek 2 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) UEA9 mod/C2-N-3389 a UEA9 mod/HCO2198 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase a (B) CPF4/CPR4 a CPF4/C2-N-3389 při použití MyFi^{TM} mix.

Obrázek 3 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) UEA9/C2-N-3389 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase a (B) C1-J1709/C2-N-3389 při použití MyFi^{TM} mix.

Obrázek 4: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery CPF4/CPR4 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase.

Obrázek 5 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s použitím primerů CPF4/CPR4 a MyTaq^{TM} DNA Polymerase.

Obrázek 6: P-distance analýza identity parciálních sekvencí COI genu u zástupců mer rodu *Cacopsylla*.

Obrázek 7: Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla picta* a dalších zástupců vektorových mer anebo mer vyskytujících se na území ČR, sestavený na základě Neighbor-joining analýzy parciální sekvence COI genu.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam přirozených hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně.

Tabulka 2: Seznam experimentálních hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně.

Tabulka 3: Seznam použitých primerů.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR při použití MyTaq™ DNA Polymerase.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR při použití MyFi™ mix.

Tabulka 6: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro sekvenační značení.

Tabulka 8: Podmínky PCR reakce pro sekvenační značení.

1 ÚVOD

Fytoplazmy jsou bakterie vyskytující se ve floému rostlin. Náleží do třídy *Mollicutes* a do rodu ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ.

Fytoplazmy vyvolávají choroby u mnoha druhů rostlin, mezi ekonomicky nejvýznamnější choroby ovocných dřevin, způsobené fytoplazmou, patří proliferace jabloně (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ), chřadnutí hrušně (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma pyriˈ) a Evropská žloutenka peckovin (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma prunorumˈ).

Závažným onemocněním jabloní je proliferace jabloně způsobená infekcí fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. Hlavním příznakem onemocnění je proliferace, dalšími příznaky u vnímavých kultivarů jsou i zvětšení palistů, chloróza a červenání listů, snížená velikost i kvalita plodů. Jejím hlavním vektorem je v podmínkách České republiky mera *Cacopsylla picta*.

Bakalářská práce je zaměřena na molekulárně-genetickou charakteristiku fytoplazmy ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, na molekulární detekci a genotypizaci jedinců jejího vektora *Cacopsylla picta*.

2 CÍLE PRÁCE

1. Literární rešerše zaměřená na biologickou a molekulárně-genetickou charakteristiku fytoplazmy ovocných dřevin ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ a jejích významných vektorů.
2. Molekulární detekce a genotypizace zástupců mery *Cacopsylla picta* za použití DNA markerů, pomocí metody PCR a sekvenování, bioinformatická analýza získaných sekvenčních dat.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika fytoplazem

Fytoplazmy, jsou jednoduché bakterie, řazené do třídy *Mollicutes*. Jejich buňky mají zaoblený až protáhlý tvar o velikosti 200–800 nm (Doi a kol., 1967), postrádají buněčnou stěnu (IRPCM, 2004) a jsou obaleny pouze jednotkovou plazmatickou membránou. Velikost jejich genomu se pohybuje od 530 do 1350 kb (Neimark a Kirkpatrick, 1993; Marcone a kol., 1999). V genu pro 16S rRNA obsahují jedinečnou, charakteristickou oligonukleotidovou sekvenci 5´-CAAGAYBATKATGTKTAGCYGGDCT-3´ (IRPCM, 2004).

Fytoplazmy se vyskytují ve floému rostlin a jejich přenos je uskutečňován pomocí hmyzích vektorů, kteří nasávají fytoplazmu spolu s floémem a tímto způsobem ji přenášejí na další rostliny. Hmyz poté často zůstává infekční po celou dobu svého života (Weintraub, 2006). Fytoplazmy vyvolávají choroby u asi tisíce druhů rostlin (Seemüller a kol., 2002). Mezi ekonomicky významné choroby zemědělských plodin způsobené fytoplazmou můžeme zařadit proliferaci jabloně (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ), která je rozšířena hlavně v Evropě, dále pak chřadnutí hrušně (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma pyriˈ) a evropskou žloutenku peckovin (způsobená fytoplazmou ˈ*Candidatus* Phytoplasma prunorumˈ) (Seemüller a Schneider, 2004).

3.1.1 Klasifikace fytoplazem

Kvůli neschopnosti kultivace fytoplazem na živných médiích (v podmínkách *in vitro)* je jejich klasifikace obtížná (IRPCM, 2004). V současné době je klasifikace fytoplazem založena na dvou systémech, jejichž základem je genetická variabilita genu pro 16S rRNA. Pomocí prvního a zároveň i historicky staršího systému jsou fytoplazmy klasifikovány do 16Sr skupin na základě RFLP analýzy 16S rDNA s použitím 17 restrikčních endonukleáz (například *MseI*, *AluI*, *RsaI*, TaqI, *HinfI* a další) (Lee a kol, 1998). Do této doby je takto popsáno třicet čtyři 16Sr skupin a více než dvě stě podskupin (Bertaccini a kol., 2019; Davis a kol., 2017). Pomocí druhého systému jsou fytoplazmy klasifikovány do provizorního rodu ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ na základě analýzy sekvence genu 16S rRNA. Pro zařazení do tohoto rodu musí fytoplazma splnit následující pravidla: popis druhu ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ by měl odkazovat na jedinečnou sekvenci genu 16S rRNA a dále zástupce druhu musí vykazovat menší než 97,5% podobnost s jakýmkoliv dříve popsaným druhem. Nicméně některé nově popsané druhy nemusí tyto požadavky splňovat. Nový druh ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ lze také popsat, pokud má vyšší než 97,5% podobnost s již existujícím druhem, ale jedná se o prokazatelně

ekologicky oddělenou populaci. V tomto případě musí být splněny následující požadavky: fytoplazmy jsou přenášeny odlišnými hmyzími vektory; liší se okruhem svých přirozených rostlinných hostitelů a existují důkazy o molekulární diverzitě, která byla zjištěna pomocí DNA hybridizace, analýzou dalších genů nebo případné sérologické reakce (IRPCM, 2004). Do současnosti bylo takto přijato nebo navrženo 48 druhů '*Candidatus* Phytoplasma' (Jardim a kol., 2021).

3.1.2 Genom fytoplazem

Genom fytoplazem je obvykle kruhový, ale pro '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' a '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' je charakteristický lineární chromozom (Kube a kol., 2008). Genom fytoplazem, jehož velikost se pohybuje od 530 do 1350 kb (Neimark a Kirkpatrick, 1993; Marcone a kol., 1999), obsahuje pouze cca 25,5 % C+G bází (Glass a kol., 2000), podobně je tomu u mykoplazmat (Glass a kol., 2000) a endosymbiotických bakterií (Tamas a kol., 2002; Wernegreen, 2002). Od živočišných mykoplazmat se fytoplazmy odlišují přítomností mezerníku mezi 16S a 23S rDNA, jehož velikost je přibližně 300 bp (Bertaccini, 2007). Pro genomy fytoplazem je charakteristická přítomnost repetitivních genových sekvencí, označovaných jako potenciální mobilní jednotky (PMU) (Bai a kol., 2006), které připomínají složené replikativní transpozony, nebo variabilní mozaiky (SVM) (Jomantiene a kol., 2007).

S rozvojem molekulárních technik přibývá kompletních sekvencí genomu fytoplazem. První kompletní sekvence genomu byla získána z kmene OY-M '*Candidatus* Phytoplasma asteris' v roce 2003 (Oshima a kol., 2004), dalšími popsanými genomy byly '*Candidatus* Phytoplasma asteris' kmen AY-WB (Bai a kol., 2006), '*Candidatus* Phytoplasma australiense' kmen PAa (Tran-Nguyen a kol., 2008), '*Candidatus* Phytoplasma mali' kmen AT (Kube a kol., 2008), '*Candidatus* Phytoplasma australiense' kmen SLY (Andersen a kol., 2013), '*Candidatus* Phytoplasma asteris' kmen M3 (Orlovskis a kol., 2017) a '*Candidatus* Phytoplasma ziziphi' kmen jwb-nky (Wang a kol., 2018). V databázi GenBank je v současné době dostupných necelých 30 kompletních sekvencí genomu fytoplazem.

3.2 Metody detekce fytoplazem

Biologické metody umožnily první pokusy o rozlišení a klasifikaci fytoplazem podle určitých biologických vlastností, jako je například okruh přirozených rostlinných hostitelů nebo přenos pomocí hmyzích vektorů (Acikgoz, 1989; Carraro a kol., 1991; Chiykowski, 1991, Credi a Santucci, 1992; Jarausch a kol., 2000a; Marcone a kol., 1997, 1999; Pastore a kol., 2001).

Dříve se detekce fytoplazem prováděla pomocí mikroskopie. K detekci fytoplazem pomocí světelné mikroskopie se nejčastěji používala metoda barvení DNA pomocí fluorochromu DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol). Tato metoda je jednoduchá, rychlá a relativně levná. Slouží ale jen k předběžné detekci, nelze díky ní určit druh fytoplazem (Seemüller, 1976; Deeley a kol., 1979).

Dalším možným způsobem detekce fytoplazem je využití metod založených na sérologii, zejména využití ELISA testu. Tato metoda poskytla spolehlivější detekci než metody založené na mikroskopii, ale kvůli obtížné a časově náročné výrobě specifických protilátek a také jejich špatné dostupnosti není tato metoda široce používána (Adams a kol., 2001). Pomocí ELISA testu byla detekována například fytoplazma RDY (Rice yellow dwarf phytoplasma) (Chang a kol., 1995), fytoplazmy AY (Aster yellows phytoplasma) (Lin a Chen, 1986) nebo fytoplazma proliferace jabloně (Loi a kol., 2002).

Pro detekci fytoplazem došlo v dnešní době k rozšíření používání molekulárních metod. Nejčastěji používanými molekulárními metodami jsou DNA hybridizace, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP) a polymerázová řetězová reakce (PCR) (Nejat a kol., 2013). Pro detekci fytoplazem se standardně používá přímá PCR, ale kvůli nízké koncentraci fytoplazem v rostlině se ke zvýšení citlivosti používá ´nested´ PCR, kdy produkt první reakce slouží jako templát pro následnou druhou amplifikaci (Andersen a kol., 1998; Gundersen a kol., 1996; Heinrich a kol., 2001). ´Nested´ PCR sice zvyšuje citlivost a přesnost reakce, ale zvyšuje také riziko křížové kontaminace a může generovat falešně pozitivní výsledky (Nejat a kol., 2013).

Nověji se intenzivně používanou metodou detekce fytoplazem stala kvantitativní PCR, označovaná jako ´real-time´ PCR, která umožňuje sledovat změnu koncentrace PCR produktu během jednotlivých cyklů. Výhodami této metody je kratší doba analýzy, rychlé zpracování vzorků a zvýšená citlivost (Nejat a kol., 2013). ´Real-time´ PCR je založena na měření emitované fluorescence během PCR amplifikace, při které se nejčastěji používají interkalační barviva nebo fluorogenní sondy. Běžně používaným interkalačním barvivem je SYBR green, jeho nevýhodou ovšem je, že se váže nespecificky do jakékoliv dvouvláknové DNA, tím ohrožuje přesnost kvantifikace a může vést k falešně pozitivním výsledkům. Z fluorogenních sond se nejčastěji používají sondy TaqMan (Christensen a kol., 2012).

Zajímavá je i metoda LAMP (loop-mediated isothermal amplification), která je ve srovnání s metodami PCR levnější a citlivější. Jedná se o izotermální amplifikaci probíhající za konstantní teploty 60–65 °C s použitím 6–8 primerů a DNA polymerázy, která slouží k detekci patogenní DNA nebo RNA (Bhat a kol., 2013; Nagamine a kol., 2002).

3.3 ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ - fytoplazma proliferace jabloně

Fytoplazma proliferace jabloně (AP), kterou způsobuje ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, je původcem významné choroby rostlin v Evropě, vyvolanou fytoplazmou (Seemüller a Schneider, 2004). Na základě RFLP analýzy 16S rRNA se fytoplazma proliferace jabloně řadí do skupiny 16SrX-A (Lee a kol., 1998). V roce 2004 byla AP, na základě sérologických srovnání a díky rozdílům v okruhu přirozených hostitelů i přenosu pomocí vektorů, popsána jako samostatný druh ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ (Seemüller a Schneider, 2004). V České republice je fytoplazma proliferace jabloně podle zákona č. 326/2004 Sb. zařazena mezi regulované škodlivé organismy a její zavlékání a rozšiřování v ČR je zakázáno.

3.3.1 Příznaky choroby způsobené fytoplazmou proliferace jabloně

Stromy napadené fytoplazmou proliferace jabloně se často vyskytují poblíž sebe a vektoři postupně rozšiřují fytoplazmu na okolní stromy (Bliefernicht a Krczal, 1995). Příznaky je nejlepší vizuálně hodnotit během sklizně, protože například k vyvinutí příznaků na plodech dochází na podzim. Příznaky by se ovšem měly hodnotit během celého vegetačního období (OEPP/EPPO, 2020). Fytoplazma proliferace jabloně vyvolává specifické (přímo souvisí s AP) a nespecifické (pokud se objeví samostatně nemusí být spojeny s AP) příznaky. Typicky specifickými příznaky choroby jsou metlovitost, zvětšené a zubaté palisty (Seemüller, 1990; Jarausch, 2007; Seemüller a kol., 2011a). Jedním z nejvýraznějších nespecifických příznaků je červenání listů (Bovey, 1963). Některé odrůdy jabloní, jako například odrůda ´Gala´, mohou místo červenání listů vykazovat před sklizní chlorózu (Schmid, 1975; Mattedi a kol., 2008a). Dalším nespecifickým příznakem je pozdní a opakované kvetení (Kartte a Seemüller, 1988). Stromy napadené fytoplazmou proliferace jabloně často vykazují sníženou vitalitu a obvod jejich kmene i průměr koruny jsou oproti zdravým stromům viditelně menší (EPPO, 1997). Plody touto chorobou postižených jabloní jsou menší, mají delší a tenčí stopku a dochází u nich ke změně chuti a barvy, čímž se stávají neprodejné (Kunze, 1976). U napadených stromů můžeme pozorovat menší a křehčí listy, tvorbu listových růžic na vrcholech větví a sníženou hmotnost kořenů, která je o cca 20–40 % menší než hmotnost kořenů u zdravých stromů (Maszkiewicz a kol., 1980; CABI, 2021; EPPO, 1997). Stromy napadené proliferací jabloně vykazují také zvýšenou citlivost k napadení padlím jabloně (*Podosphaera leucotricha*) (Németh, 1986). U většiny kultivarů infekce fytoplazmou proliferace jabloně ale nevede k úhynu napadeného stromu (Schaper a Seemüller, 1984).

Koncentrace fytoplazmy proliferace jabloně se během roku mění. Fytoplazmy sídlí ve floému rostlin a jelikož na konci vegetačního období (začátek zimy) dochází v nadzemních částech rostliny k částečné degradaci floému, snižuje se zde i koncentrace fytoplazmy. V kořenech nedochází k této částečné degradaci floému, a proto zde patogen přežívá celý rok. Koncem jara až začátkem léta, kdy dojde k znovuobnovení funkce floému, dochází k rekolonizaci nadzemních částí rostliny (Schaper a Seemüller, 1984; Seemüller a kol., 1984a, 1984b; Loi a kol., 2002; Pedrazzoli a kol., 2008; Baric a kol., 2011).

Bylo zjištěno, že rostliny jsou chorobou proliferace jabloně ovlivňovány velmi rozdílně. Podle stupně virulence se kmeny fytoplazem rozdělují na avirulentní a mírné kmeny (chybějící nebo mírné příznaky, jako mírné až střední červenání listů a vzácně zvětšení palistů), středně virulentní kmeny (ovlivnění vitality rostliny) a silně virulentní kmeny (silné ovlivnění vitality) (Seemüller a Schneider, 2007).

Fytoplazmy se mohou vyskytovat v latentním stádiu infekce, kdy na napadených stromech nezpůsobují typické příznaky, ale napadený strom stále může být zdrojem infekce pro další rostliny. Toto období latence, tedy období od infekce rostliny do projevu prvních příznaků, může přetrvávat i několik let. Baric a kol. (2007) v Jižním Tyrolsku provedli studii, která měla odhalit rozsah latentních infekcí v komerčním a v mladém jabloňovém sadu. Bylo odhaleno, že v komerčním sadu byla skutečná míra infekce (která zde činila 3,8 %) více než dvakrát větší, než infekce zjištěná pouhým pozorováním příznaků.

U jabloní kultivaru ´Florina´ byl pozorován spontánní ústup příznaků - tento jev byl popsán jako ´phenomen of recovery´ (Osler a kol., 2000). Tyto stromy ovšem nebyly úplně zbaveny fytoplazmy, pouze u nich došlo k vymizení typických příznaků. I přes absenci příznaků v nadzemních částech rostliny, je fytoplazmu stále možné detekovat v kořenech a jabloň tedy i nadále zůstává infikovaná a je možné vegetativním rozmnožováním (například pomocí roubování kořenů) fytoplazmu přenášet (Carraro a kol., 2004). Po tomto bezpříznakovém období může v nadzemních částech stromu opět dojít k obnovení příznaků (Osler a kol., 2000; Carraro a kol., 2004; Seemüller a kol., 1984b, 2010).

3.3.2 Ekonomický význam fytoplazmy proliferace jabloně

Fytoplazma proliferace jabloně je ekonomicky významný patogen, který v případě epidemického výskytu může vést k obrovským ztrátám na výnosech a k ekonomickým škodám v oblasti pěstování jablek. Fytoplazma proliferace jabloně totiž snižuje množství a kvalitu plodů, tyto plody bývají menší, neúplně vybarvené a mají horší chuť (CABI, 2021), což negativně ovlivňuje jejich prodejnost (Seemüller a kol., 2011a). Za vypuknutí choroby v roce

2001 byly ekonomické ztráty v Itálii odhadnuty na 100 milionů € a v Německu na 25 milionů € (Strauss, 2009). V roce 2005 a 2006 čelilo Jižní Tyrolsko, které je největší souvislou oblastí pro pěstování jablek v Evropě, masivnímu propuknutí choroby (Oettl, 2015).

3.3.3 Okruh hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně

Do okruhu hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně se řadí většina odrůd jabloní (*Malus* spp.), z nichž se za hlavní hostitele považují odrůdy *Malus domestica* L. a *Malus pumila* MILL. Hostitele fytoplazmy proliferace jabloně rozdělujeme na přirozené a experimentální.

Malus baccata L., *M. coronaria* (L.) MILL., *M. domestica*, *M. floribunda* Siebold ex Van Houtte, *M. fusca* (Raf.) Schneid., *M. x gloriosa*, *M. ioensis* (Wood) Britt., *M. x platycarpa*, *M. x purpurea*, *M.* x *robusta* (Carrière) Rehder mohou být infikovány fytoplazmou proliferace jabloně vegetativním rozmnožováním pomocí roubů (Németh, 1986). U druhu *Malus sieboldii* (Regel) Rehd. byla zjištěna rezistence proti ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ (Seemüller a kol., 2008). Kromě rodu *Malus* byla infekce fytoplazmy proliferace jabloně zaznamenána například i u hrušně obecné (*Pyrus communis* L.) nebo u révy vinné (*Vitis vinifera* L.) (viz Tabulka 1). Experimentálním hostitelem fytoplazmy proliferace jabloně je například tabák virginský (*Nicotiana tabacum* L.) (viz Tabulka 2).

Odrůdy jabloní, které napadá fytoplazma proliferace jabloně, můžeme rozdělit na citlivé, středně citlivé, vysoce citlivé a tolerantní vůči napadení touto fytoplazmou. Za citlivé jsou považovány odrůdy ´Belle de Booskop´, ´Gravestein´, ´Golden Delicious´ a ´Winter Banana´ (CABI, 2021), mezi středně citlivé odrůdy patří ´Idared´, ´McIntosh´, ´Starking´ a ´Starkrimson´ (Németh, 1986). Nejmenší zastoupení mají vysoce citlivé odrůdy, za které se považuje ´Florina´, ´Prima´ a ´Priscilla´ (Loi a kol., 1995) a za tolerantní vůči napadení fytoplazmy proliferace jabloně jsou považovány druhy ´Roja de Benejama´ (CABI, 2021), ´Antonokova´, ´Cortland´, ´Spartan´, ´Yellow transparent´, ´Wealthy´ (Németh, 1986). Odrůdy ´Prima´, ´Florina´ a ´Priscilla´, které jsou odolné vůči strupovitosti (*Venturia inaqualis*), byly odvozeny z odrůd citlivých (mezi které se řadí ´Golden Delicious´, ´Starking Delicious´, ´McIntosh´, ´Jonathan´, ´Rome Beauty´ a ´Malus floribunda 821´) (Kartte a Seemüller, 1988).

Tabulka 1: Seznam přirozených hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně.

Latinské jméno	**České jméno**	**Čeleď**	**Reference**
Malus domestica Borkh.	jabloň domácí	*Rosaceae*	Seemüller a Schneider, 2004
Malus pumila Mill.	jabloň nízká	*Rosaceae*	Bertamini a kol., 2002
Pyrus communis L.	hrušeň obecná	*Rosaceae*	Lee a kol., 1995
Pyrus pyrifolia Burm. f.	hrušeň asijská	*Rosaceae*	Lee a kol., 1995
Prunus domestica L.	slivoň švestka	*Rosaceae*	Mehle a kol., 2007
Prunus salicina Lindl.	slivoň vrbová	*Rosaceae*	Lee a kol., 1995; Barthel a kol., 2020
Prunus armeniaca L.	meruňka obecná	*Rosaceae*	Mehle a kol., 2007
Prunus avium L.	třešeň ptačí	*Rosaceae*	Mehle a kol., 2007
Prunus persica L.	broskvoň obecná	*Rosaceae*	Cieślinska a Morgas, 2010
Crataegus monogyna Jacq.	hloh jednosemenný	*Rosaceae*	Tedeschi a Alma, 2007
Corylus avellana L.	líska obecná	*Betulaceae*	Marcone a kol., 1996a
Carpinus betulus L.	habr obecný	*Betulaceae*	Seemüller, 2002; Barthel a kol., 2020
Convolvulus arvensis L.	svlačec rolní	*Convolvullaceae*	Seemüller a kol., 2002
Dahlia cultorum	jiřina	*Asteraceae*	Kaminśka a Śliwa, 2008a
Lilium spp. L.	lilie	*Liliaceae*	Kaminśka a Śliwa, 2008b
Vitis vinifera L.	réva vinná	*Vitaceae*	Matus a kol., 2008

Tabulka 2: Seznam experimentálních hostitelů fytoplazmy proliferace jabloně.

Latinské jméno	**České jméno**	**Čeleď**	**Reference**
Catharanthus roseus (L.) G. Don	barvínkovec růžový	*Apocynaceae*	Musetti a kol., 2011
Nicotiana occidentalis	tabák	*Solanaceae*	Rid a kol., 2016
Nicotiana tabacum L.	tabák virginský	*Solanaceae*	Berg a kol., 1999
Cynodon dactylon (L.) Pers.	troskut prstnatý	*Poaceae*	CABI, 2021

3.3.4 Geografické rozšíření fytoplazmy proliferace jabloně

Prvními zeměmi, ve kterých byl v 50. letech 20. století zaznamenán výskyt fytoplazmy proliferace jabloně, bylo Německo (Kunze, 1989) a Itálie (provincie Jižní Tyrolsko) (Marcone a kol., 1996b). Ve Velké Británii byla fytoplazma v roce 1985 vymýcena (Davies a kol., 1986). Do dnešního dne byl výskyt fytoplazmy proliferace jabloně zaznamenán v Africe (Jižní Afrika, Tunisko) (Seemüller, 1990; CABI/EPPO, 2013), Asii (Indie, Libanon, Sýrie, Turecko) (Seemüller, 1990; Tedeschi a kol., 2015; CABI/EPPO, 2013; Canik a Ertunc, 2007), Severní Americe (Kanada) (EPPO, 2021) a dále je také rozšířena po celé Evropě (Albánie, Belgie, Bělorusko, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Česká republika, Dánsko, Estonsko, Finsko, Francie, Chorvatsko, Itálie, Kypr, Litva, Maďarsko, Moldavsko, Německo, Norsko, Nizozemí, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko, Řecko, Srbsko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švýcarsko, Ukrajina a Velká Británie) (Myrta a kol., 2003; Németh, 1986; Valasevich a Schneider, 2016; Delic a kol., 2005; Križanac a kol., 2010; EPPO, 2021; Fránová a kol., 2013; CABI/EPPO, 2013; Jarausch a kol., 1994; Lorenz a kol., 1995; Serrone a kol., 1998; Firrao a kol., 1993; Kamińska a Śliwa, 2007; Paltrinieri a kol., 2010; Mehle a kol., 2007; Avinet a Llácer, 1995; Davies a kol., 1986).

3.4 Genetická charakteristika fytoplazmy proliferace jabloně

Fylogenetická analýza odhalila, že fytoplazmy ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, ˈ*Candidatus* Phytoplasma pruniˈ a ˈ*Candidatus* Phytoplasma prunorumˈ vykazují vysokou podobnost v 16S rDNA sekvenci, jejich podobnost odpovídá 98,6–99 %. Na pozici 1393–1409 byla pro fytoplazmy proliferace jabloně identifikována jedinečná sekvence 5´-AATACTCGAAACCAGTA-3´ (Seemüller a Schneider, 2004).

Pro diferenciaci mezi jednotlivými skupinami fytoplazem se používá jak variabilita genu pro 16S rRNA, tak i sekvencí genů *tuf, secY, secA, groEL* kódující ribozomální proteiny a genů *rpoB* (Marcone a kol., 2000; Lee a kol., 2006; Hodgetts a kol., 2008; Mitrović a kol., 2011; Valiunas a kol., 2013; Martini a kol., 2007).

Základem analýzy 16S-23S rDNA je zjištění genetické variability ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ na základě výsledků PCR-RFLP s použitím restrikční endonukleázy *Hpa*II. Díky této analýze rozlišujeme dva restrikční profily: P-I a P-II (Cieślińska a kol., 2015). U kmenů ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ z Bulharska, Polska, Itálie a České republiky byly získány oba tyto restrikční profily (Martini a kol., 2007; Casati a kol., 2010; Paltrinieri a kol., 2010; Fránová a kol., 2013; Cieślińska a kol., 2015).

Na základě genů kódujících ribozomální proteiny rpl22-rps3 pomocí RFLP analýzy amplikonů rpAP15f/rpAP15r došlo s použitím restrikční endonukleázy *Alu*I k rozlišení čtyř odlišných restrikčních profilů: rpX-A, rpX-B, rpX-C a rpX-D (Martini a kol., 2005, 2008).

RFLP analýzou genu pro nitroreductase-like protein amplikonů AP13/AP10 došlo pomocí restrikčních endonukleáz *Rca*I a *Hinc*II k rozlišení tří různých podtypů AP: AT-1, AT-2 a AP-15 (Jarausch a kol., 2000b). Bylo zjištěno, že podtypy AT-2 a AP-15 se vyskytovaly ve Francii, Německu, Španělsku (pouze podtyp AT-2), Švýcarsku, Rakousku, Rumunsku (pouze podtyp AP-15) a Itálii (pouze podtyp AP-15), zatímco podtyp AT-1 se vyskytoval pouze ve Francii a Německu (Jarausch a kol., 2000b).

Molekulární analýza genu ATP00464 pro *HflB* polymerázu ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ odhalila sekvenční polymorfismy v rámci tohoto taxonu. Rozlišení ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ bylo dosaženo pomocí single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Schneider a Seemüller, 2009). *HflB* je ATP-dependentní membránově asociovaná Zn^{2+} polymeráza spojená s degradací proteinů, která je přímo zapojena do membránového transportu (Bonas, 1994), a to díky působení proti membránovým proteinům, jako je SecY (Ito a Akiyama, 2005). U fytoplazem může být přítomna až ve 24 kopiích, na rozdíl od většiny bakterií, kde je přítomna jen jako jediná kopie (Bai a kol., 2006; Arashida a kol., 2008; Seemüller a kol., 2011b). U ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ byla polymeráza *HflB* identifikována ve čtyřech kopiích (Jollard a kol., 2019; Kube a kol., 2008).

3.5 Způsob přenosu a šíření fytoplazmy proliferace jabloně

Přenos fytoplazem probíhá dvojím způsobem, kdy první způsob je realizován pomocí hmyzích přenašečů a druhý vznikl důsledkem lidské činnosti. Člověk může šíření fytoplazem zajistit pomocí vegetativního rozmnožování, kdy se jedná nejčastěji o řízkování nebo štěpování, prostřednictvím infikovaného roubu nebo očka (Seemüller a kol., 2011a). Dále může docházet k experimentálnímu přenosu fytoplazmy pomocí parazitických rostlin, z nichž mezi hlavní přenašeče patří druhy z rodu kokotic, zejména *Cuscuta subinclusa* (Carraro a kol., 1988; Görg a kol., 2021). Přenos pylem ani semeny nebyl doposud prokázán (CABI, 2021). Přirozeně jsou fytoplazmy šířeny hmyzími vektory, z nichž mezi primární přenašeče můžeme zařadit hmyzí zástupce z rodu *Cacopsylla* (Hemiptera: Sternorryncha: Psyllidae). Hlavními přenašeči AP jsou *Cacopsylla picta* (Foerster) a *Cacopsylla melanoneura* (Foerster). Významným vektorem v Americe je *Fieberiella florii* (Stål) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae), která je za přenašeče fytoplazmy proliferace jabloně považována také v Itálii a Německu (Frisinghelli

a kol., 2000; Tedeschi a kol., 2002; Jarausch a kol., 2003; Tedeschi a Alma, 2006; Carraro a kol., 2008; Alma a kol., 2015.; Oppedisano a kol., 2019).

3.5.1 Mery Cacopsylla picta a Cacopsylla melanoneura

Mery *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura* mají podobný životní cyklus. Jsou univoltinní, mají pouze jednu generaci za rok a dochází u nich ke dvěma změnám hostitelů. Na jejich primární hostitelské rostlině dochází na jaře a počátkem léta k vývoji z nymfálního stádia v dospělé jedince. Tito dospělci poté migrují na jehličnany, kde tráví zbytek léta, podzim a zimu. Během následujícího jara dospělí jedinci migrují zpět na své hostitelské rostliny, kde poté dochází k jejich reprodukci (Ossiannilsson, 1992; Lauterer, 1999; Mayer a kol., 2011). Vývoj larev trvá čtyři až pět týdnů. Mladí dospělci mají světle zelenou barvu, později se jejich barva mění na špinavě žlutou nebo oranžovou s tmavě hnědými nebo černými znaky (Ossiannilsson, 1992). Během hibernace se barva jejich těla změní na černohnědou (Lauterer, 1999). Velikost těla a počet snesených vajíček se u obou druhů patrně liší. Samci *Cacopsylla picta* mají velikost těla 2,86–3,24 mm, samice 3,14–3,43 mm a každá samice může snést až 160 vajíček (Ossiannilsson, 1992). Samci *Cacopsylla melanoneura* pak mají velikost těla 2,52–3,10 mm, samice 2,95–3,30 mm a každá samice může snést až 200 vajíček. Morfologické rozlišení jednotlivých druhů rodu *Cacopsylla* je obtížné (Tedeschi a kol., 2009), proto byly vyvinuty metody založené na PCR, které umožňují rozlišení různých druhů *Cacopsylla* (Oettl a Schlink, 2015).

Cacopsylla picta je monofágní, s výskytem pouze na rostlinách rodu *Malus* spp., zatímco *Cacopsylla melanoneura* je oligofágní na rostlinách rodu *Malus* spp., *Crataegus* spp. a příležitostně i na *Pyrus* spp. (Mattedi a kol., 2008b; Tedeschi a kol., 2012).

Přenos fytoplazem pomocí hmyzích vektorů je přenosem perzistentním. Koncentrace fytoplazmy v hmyzím vektoru závisí na koncentraci fytoplazmy ve zdrojové rostlině (Tedeschi a kol., 2012), délce akvizice a schopnosti fytoplazmy akumulovat se v hmyzím vektoru (Hogenhout a kol., 2008).

Cacopsylla picta byla jako vektor proliferace jabloně pozorována ve střední a jižní Evropě, vyskytuje se například v Polsku (Cieślińska a Borisova, 2019), Bulharsku (Etropolska a kol., 2015), Itálii (Oettl a Schlink, 2015), Německu, severním Švýcarsku, severní Francii (Jarausch a kol., 2007) a v České republice (Čermák a Lauterer, 2008). *Cacopsylla melanoneura* byla jako vektor proliferace jabloně pozorována například v Polsku (Cieślińska a Borisova, 2019) a Německu (Jarausch a kol., 2007), ale mezi hlavní oblast jejího výskytu jako vektora proliferace jabloně patří severozápadní Itálie (Tedeschi a kol., 2002).

O přenosu fytoplazmy proliferace jabloně pomocí vektora *Cacopsylla melanoneura* se vedou četné diskuse, oproti tomu o významu *Cacopsylla picta* jako hlavního přenašeče fytoplazmy proliferace jabloně nemůže být pochyb. Toto tvrzení dokazuje také průzkum probíhající mezi lety 2002–2007 v sadech v Německu, severní Francii a severním Švýcarsku, kdy bylo zjištěno, že i přes 3–10x větší hustotu populace *Cacopsylla melanoneura*, jsou jedinci *Cacopsylla picta* přirozeně infikováni ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ častěji než jedinci *Cacopsylla melanoneura*. Pokusy o přenos fytoplazmy proliferace jabloně za kontrolovaných podmínek prokázaly, že pouze *Cacopsylla picta* byla schopna infikovat zdravé rostliny (Jarausch a kol., 2007). Bylo zjištěno, že na rozdíl od zástupců *Cacopsylla melanoneura* u jedinců *Cacopsylla picta* dochází k transovariálnímu přenosu fytoplazmy proliferace jabloně na potomstvo. Toto zjištění by mohlo vysvětlovat, že *Cacopsylla melanoneura* sice je vektorem fytoplazmy proliferace jabloně, ale méně účinnějším než *Cacopsylla picta* (Mittelberger a kol., 2016).

3.5.2 Fieberiella florii

Křísek *Fieberiella florii* (Stål) je od ostatních druhů lehce odlišitelná díky silnému černému pruhu, který se táhne od oka k oku a přítomnosti malých černých teček vyskytujících se na přední části těla a zadních křídlech. Nymfy bývají zelenožluté s černými tečkami. *Fieberiella florii* může žít na mnoha druzích stromů a keřů, mezi nimiž preferuje rostliny čeledi *Rosaceae*, na kterých jako nymfa přezimuje (Janik a kol., 2020; Swenson, 1974).

V Severní Americe je považována za jeden z hlavních přenašečů fytoplazmy označované jako ´X-disease phytoplasma´ (ˈ*Candidatus* Phytoplasma pruniˈ). V 80. letech 20. století se na základě exprese symptomů a fluorescenčního mikroskopování předpokládalo, že *F. florii* je potenciálním vektorem ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. V roce 2006 byl v Itálii tento předpoklad potvrzen a bylo prokázáno, že *Fieberiella florii* úspěšně přenášela fytoplazmu proliferace jabloně. V severozápadní Itálii, kde byl tento výzkum prováděn, bylo ale zjištěno, že riziko infekce jabloní *Fieberiella florii* je, vzhledem k jejímu nízkému výskytu v jabloňových sadech a relativně neefektivní schopnosti přenosu, nízké (Tedeschi a Alma, 2006).

3.6 Interakce hostitel-patogen

Fytoplazmy interagují se svou hostitelskou rostlinou na různých úrovních, mezi které můžeme zařadit například ovlivnění fyziologických a biochemických procesů rostliny nebo blokaci transportu floému (Kartte a Seemüller, 1991; Lepka a kol., 1999).

Interakce hostitele a patogena byla studována na odolné jabloni *Malus sieboldii* a vnímavé jabloni *Malus domestica*, odrůdy ´Golden Delicious´. Při sledování bylo zjištěno, že v těchto odrůdách dochází k rozdílné regulaci hladiny tří genů, které se podílejí na elektronovém transportu, produkci H_2O_2 a signalizaci. Pomocí genové exprese a následné cytochemické analýzy bylo také zjištěno, že u vnímavé odrůdy jabloně *Malus domestica* ´Golden Delicious´ dochází k výrazné změně v buněčné organizaci, zatímco u rezistentní jabloně *Malus sieboldii* byl tento jev pozorován pouze minimálně (Moser, 2011).

3.7 Molekulární determinace vektorů fytoplazem

Morfologická identifikace mer je obtížná, z toho důvodu se diskutuje o možnosti použití molekulárních technik a determinaci. Nejvhodnější se zdá být použití mitochondriální DNA a cytochrom oxidázy kódující podjednotku I a II.

Při fylogenetických studiích na zvířatech se velmi často využívá mitochondriální DNA. Zvláště vhodným markerem pro evoluční studie se, díky svým charakteristickým vlastnostem, stal mitochondriální gen cytochrom oxidázy kódující podjednotku I (COI). Mezi jeho charakteristické vlastnosti patří například to, že COI je největší ze tří mitochondriálních genů kódující podjednotky cytochrom c oxidázy (COI, COII a COIII) a je také jedním z největších genů kódujících proteiny v mitochondriálním genomu metazoa. Díky tomu je možné amplifikovat a sekvenovat více nukleotidů než u jakéhokoliv jiného mitochondriálního genu (Lunt a kol., 1996). Molekulární metodou, používanou k identifikaci a rozlišení různých druhů rodu *Cacopsylla*, je PCR-RFLP založená právě na oblasti podjednotky I cytochrom c oxidázy. Tato metoda byla úspěšně použita na molekulární odlišení *C. picta* a *C. melanoneura* (Oettl a Schlink, 2015). Oettl a Schlink (2015) vyvinuli identifikační klíč, díky kterému bylo možné rozlišit 10 známých druhů mer. Srovnáním délky fragmentů s markerem relativní molekulové hmotnosti bylo zjištěno, že restrikční profily *C. picta* a *C. melanoneura* byly pro každou z nich unikátní a bylo tak možné jednoznačně odlišit tyto dva hlavní vektory AP, ale také osm dalších známých druhů rodu *Cacopsylla*. Ve srovnání s dříve provedenou morfologickou identifikací vykazovaly výsledky rozlišení druhů rodu *Cacopsylla* pomocí PCR-RFLP 98% shodu. Tato molekulární metoda také umožnila rozlišit vektory ve stádiu nymfy, u kterých ještě nedošlo k vyvinutí dostatečných morfologických znaků, nebo i vektory, kteří byli poškozeni při sundávání z lepových desek, použitých k jejich odchytu. Jedná se o dosud jedinou známou molekulární techniku, která od sebe umožňuje rozlišit dva hlavní vektory fytoplazmy proliferace jabloně, *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura*.

3.8 Fytoplazma proliferace jabloně v České republice

V České republice byla fytoplazma proliferace jabloně poprvé pozorována ve starších sadech v 60. letech 20. století a choroba zde byla nejčastěji šířena roubováním (Blattný a kol., 1963). Likvidace nemocných stromů v sadech nepřinesla významné ovlivnění šíření AP v České republice. Hlavním důvodem bylo pravděpodobně to, že stromy byly ze sadů odstraňovány, až když začaly projevovat příznaky AP, ale pro ostatní rostliny mohly být infekční mnohem dříve. Ke snížení výskytu fytoplazmy proliferace jabloně pomohla až aplikace insekticidů (Blažek a kol., 2005) a používání zdravého rozmnožovacího materiálu, díky kterému mezi lety 1965–1995 výskyt AP výrazně poklesl. Od roku 1995 došlo v Evropě i České republice opět k nárůstu výskytu fytoplazmy proliferace jabloně, který měl za následek vznik lokálních epidemií (Blystad a kol., 2012; Frisinghelli a kol., 2000; Loi a kol., 1995, Blažek a kol., 2005; Fialová a kol., 2003; Navrátil a kol., 1998).

Kmeny AP, které byly detekovány v České republice, nejčastěji náleží do podskupiny ribozomálních proteinů rpX-A, podtypů AP-15 a AT-2. Izoláty patřící do podskupiny rpX-B, podtypu AT-1, byly v České republice detekovány pouze ojediněle a zřejmě se častěji vyskytují na Moravě, kde je teplejší podnebí (Fránová a kol., 2013). Analýzou diverzity v oblasti 16S-23 rDNA bylo zjištěno, že izoláty AP v České republice nejčastěji přísluší ke genotypové linii ´2a´ a profilu P-I (Fránová a kol., 2013).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části bylo testováno 45 vzorků mer *Cacopsylla picta*, vektora fytoplazmy ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. Vzorky pocházely ze čtyř lokalit na Moravě: Kozov (odchyt proveden 6. 5. 2015, označení vzorků 491/13–22), Brno-Starý Lískovec (odchyt 5. 4. 2005, vzorek 51), Velké Bílovice (odchyt 27. 4. 2005, vzorky 61A/1–8; 61C/11–12) a Drahanská vrchovina (odchyty 10. 2. 2012 - vzorky 357/1–6; 11. 1. 2012 - vzorky 359/1–6, a 26. 7. 2008 - vzorek 361) a poté byly uchovávány v 96% etanolu při teplotě -20 °C.

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)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, kat. č. 41002)
- 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-21106)
- TAE pufr 1x
- UltraPure™ Calf Thymus DNA Solution (Invitrogen, kat. č. 15-633-019)

Použité soupravy

- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, kat. č. 4336917)
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250)

Použité roztoky

- TAE (50x) pufr (242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml ledové kyseliny octové, deionizovanou vodou doplnit na objem 1000 ml)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga (Prism^{TM} mini, Labnet)
- Centrifuga (Spectrafuge 24D, Labnet)
- Elektroforetická komora (HU10 mini, Fisherbrand)
- Flowbox (PV-100, Telstar)
- Fluorimetr (DyNa Quant 200, Hoefer)
- Mikrovlnná trouba (MA85050, OTF)
- Minicentrifuga (C1316, Greg)
- Transiluminátor - dokumentační systém Syngene (G:BOX, Syngene)
- Thermocycler (Thermal cycler T 100^{TM}, Biorad)
- Thermocycler (T-Personal B/N, Biometra)
- Váhy (440-33N, KERN)
- Vortex (MS1 minishaker, MANEKO)
- Zdroj stejnosměrného proudu (Major Science MP-250V, Biotech)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace COI genu mitochondriální DNA fytoplazmy ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce. Seznam použitých primerů, jejich sekvence a velikost produktu jsou uvedeny v Tabulce 3. Všechny použité primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech s.r.o.

Tabulka 3: Seznam použitých primerů.

Název primeru	Sekvence 5´–3´	Velikost PCR produktu (bp)	Reference
UEA 9	GTAAACCTAACATTTTTTCCTCAACA	667–677	Lunt a kol. (1996)
C2-N-3389	TCATAAGTTCAGTATCATTG		Simon a kol. (1994)
UEA9 mod	GTAAATTTAACATTTTTTCCYCAACA	667–677	Bernasconi a kol. (2000)
C2-N-3389	TCATAAGTTCAGTATCATTG		Simon a kol. (1994)
C1-J1709	AATTGGGGGGTTTGGAAATTG	510	Simon a kol. (2006)
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		Folmer a kol. (1994)
UEA9 mod	GTAAATTTAACATTTTTTCCYCAACA	2759–3547	Bernasconi a kol. (2000)
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		Folmer a kol. (1994)

Pokračování Tabulky 3:

Název primeru	Sekvence 5´–3´	Velikost PCR produktu (bp)	Reference
C1-J1709	AATTGGGGGGTTTGGAAATTG	1707–1711	Simon a kol. (2006)
C2-N-3389	TCATAAGTTCAGTATCATTG		Simon a kol. (1994)
CPF4	TAAGAACTAACCATAAGATTATCGG	1906–1915	Kang a kol. (2012)
C2-N-3389	TCATAAGTTCAGTATCATTG		Simon a kol. (1994)
CPF4	TAAGAACTAACCATAAGATTATCGG	707	Kang a kol. (2012)
CPR4	CACTTCAGGGTGTCCAAAGAATC		Kang a kol. (2012)

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase.

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	Pipetované množství na 1 test [µl] *	Pipetované množství na 1 test [µl] **
Pufr	5 x	1 x	5,00	5,00
Deionizovaná voda			16,80	17,80
F primer	20 pmol·µl^{-1}	0,4 pmol·µl^{-1}	0,50	0,50
R primer	20 pmol·µl^{-1}	0,4 pmol·µl^{-1}	0,50	0,50
Taq DNA polymeráza	5 U·µl^{-1}	1 U·reakce^{-1}	0,20	0,20
Objem reakční směsi			23 µl	24 µl
Objem vzorku			2 µl	1 µl
Objem reakce			25 µl	25 µl

* Zastoupení látek v reakční směsi pro PCR s 2 µl vzorku.

** Zastoupení látek v reakční směsi pro PCR s 1 µl vzorku.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR při použití MyFi^{TM} mix.

Položka	Koncentrace prac. roztoku	Konečná koncentrace	Pipetované množství na 1 test [µl]
Pufr	2 x	1 x	12,50
Deionizovaná voda			11,00
F primer	20 pmol·µl^{-1}	0,25 pmol·µl^{-1}	0,25
R primer	20 pmol·µl^{-1}	0,25 pmol·µl^{-1}	0,25
Objem reakční směsi			24 µl
Objem vzorku			1 µl
Objem reakce			25 µl

Tabulka 6: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce.

Primery	Počáteční denaturace	Denaturace	Hybridizace	Elongace	Konečná elongace
C1-J1709/HCO2198	95 °C, 3 min	95 °C, 30 s	45 °C, 30 s	72 °C, 30 s	72 °C, 5 min
			40 cyklů		
UEA9/C2-N-3389	95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	45 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 5 min
			40 cyklů		
UEA9 mod/ HCO2198	95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	53 °C, 1 min	72 °C,2,5 min	72 °C, 5 min
			40 cyklů		
C2-N-3389/C1-J1709	95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	43 °C, 1 min	72 °C, 2 min	72 °C, 5 min
			40 cyklů		
CPF4 /CPR4	95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	54 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 5 min
			40 cyklů		
CPF4/C2-N-3389	95 °C, 3 min	95 °C, 1 min	45 °C, 1 min	72 °C, 2 min	72 °C, 5 min
			40 cyklů		

4.4.2 Elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu

Produkty PCR amplifikace byly detekovány pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu pomocí následujícího postupu:

1. 1% agarózový gel byl připraven smícháním 3 g agarózy s 300 ml 1x TAE pufru a jejím rozpuštěním zahřátím v mikrovlnné troubě.
2. K 50 ml roztoku agarózy (vychladlého asi na 60 °C) bylo přidáno 2,5 µl GelRed Nucleic Acid Stain. Směs byla promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s vloženým hřebínkem.
3. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické komůrky a převrstven 1x TAE pufrem.
4. Do první jamky bylo napipetováno 1,5 µl standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp Plus. Do dalších jamek bylo pipetováno 5 µl vzorku.
5. Elektroforetická separace probíhala při 80 V po dobu 30–45 min.
6. PCR amplikony byly vizualizovány pomocí dokumentačního zařízení G:BOX Syngene.

4.4.3 Pročištění PCR produktů

Získané PCR produkty byly izolovány pomocí kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609.250). Postup byl následující:

1. Byl připraven pracovní roztok NTI pufru v poměru 1:7 (NTI pufr:deionizovaná voda).
2. Izolační NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonka (dále jen kolonka) byla umístěna do sběrné zkumavky. PCR produkt byl doplněn vodou na objem 100 µl, poté bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku NTI pufru a vše bylo napipetováno do kolonky. Následně byla provedena centrifugace 1 min při 11 000 g. Filtrát byl odstraněn a kolonka vrácena do původní sběrné zkumavky.
3. Do kolonky bylo přidáno 650 µl NT3 pufru a ta byla následně centrifugována 1 min při 11 000 g. Filtrát byl poté odstraněn a tento krok byl ještě jednou zopakován.
4. Následně byla kolonka stočena naprázdno po dobu 2 min při 11 000 g.
5. Sběrná zkumavka byla následně vyhozena a kolonka umístěna do nové 1,5 ml mikrozkumavky.
6. Bylo přidáno 25 µl NE pufru na povrch frity a kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě.
7. Následně byla provedena centrifugace 1 min při 11 000 g.
8. Koncentrace izolované DNA byla stanovena fluorometricky pomocí fluorimetru (DyNa Quant 200, Hoefer) a poté byla uchovávána při -20°C.

4.4.4 Sangerovo sekvenování

Z celkového počtu 45 vzorků byly PCR produkty získány u 29 vzorků. Dál bylo pracováno pouze s 26 vzorky u kterých bylo poté provedeno sekvenační značení. Sekvenační reakce byla provedena pomocí BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit v celkovém objemu 10 µl, složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 7. K reakční směsi bylo přidáno 7 µl templátové DNA izolované v předchozím kroku, která byla naředěna tak, aby pro sekvenační reakci bylo použito 25 ng DNA. Vlastní PCR amplifikace probíhala podle pokynů výrobce, podmínky jsou uvedeny v Tabulce 8.

Vlastní sekvenování bylo provedeno v sekvenačním centru Ústavu experimentální botaniky, AV ČR, Olomouc, s použitím genetického analyzátoru ABIPRISM 3730 (Applied Biosystems).

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro sekvenační značení.

Reakční směs	Množství na 1 reakci [µl]
Pufr 10x	1
BigDye	1
Primer (3,2 pmol)	1

Tabulka 8: Podmínky PCR reakce pro sekvenační značení.

Teplota	Doba	Počet cyklů
95 °C	1 min	1x
95 °C	10 s	40x
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	

4.4.5 Bioinformatická analýza sekvencí

Výstupy z ABIPRISM 3730 analyzátoru byly složeny do konečných sekvencí pomocí programu MEGA 7.0. Identita sekvencí byla potvrzena srovnáním se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank za použití programu BlastN (BLAST, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Sekvence byly porovnány s odpovídajícími sekvencemi *Cacopsylla picta* a se sekvencemi dalších zástupců rodu *Cacopsylla* dostupnými v databázi GenBank. Pomocí programu ClustalW byly sekvence seřazeny v mnohočetné aligmenty. Variabilita izolátů byla vyhodnocena pomocí metody p-distance. Fylogenetická analýza izolátů byla poté provedena pomocí Neighbor-Joining metody a Tamura 3-parametrického modelu, 1000x bootstrap opakování, sekvence *Trioza cerastii* byla použita jako outgroup k zakořenění stromu. Výsledný fylogenetický strom byl vizualizován prostřednictvím programu TreeExplorer. Všechny analýzy byly provedeny v programu MEGA 7.0 (Kumar a kol., 2016).

5. VÝSLEDKY

Cílem experimentální části bakalářské práce byla molekulárně genetická charakteristika mery *Cacopsylla picta*, vektora fytoplazmy proliferace jabloně.

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

Bylo provedeno ověření primerů pro amplifikaci oblasti COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA mery *Cacopsylla picta* a optimalizace podmínek PCR reakce. Na základě dostupné literatury bylo u pěti kontrolních vzorků (označení vzorků 491/1–2, 492/1–2, 492/24) testováno 7 kombinací primerů a to: UEA9/C2-N-3389, UEA9 mod/C2-N-3389, C1-J1709/HCO2198, UE9 mod/HCO2198, C1-J1709/C2-N-3389, CPF4/C2-N-3389, CPF4/CPR4 a dvě různé polymerázy MyTaq^{TM} DNA Polymerase a MyFi^{TM} DNA Polymerase (MyFi^{TM} mix) (obě Bioline).

Specifické produkty o očekávané velikosti cca 500 bp byly získány při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase s primery C1-J1709/HCO2198 a produkty o očekávané velikosti 700 bp byly získány při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase s primery CPF4/CPR4 (viz Obrázek 1).

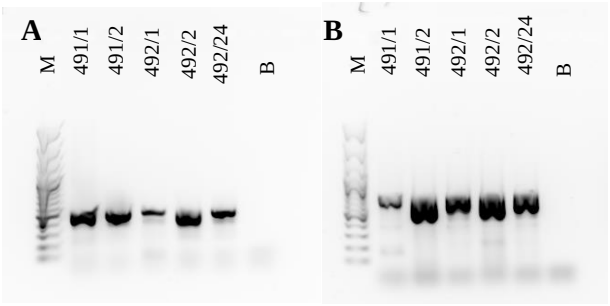
Při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase s primery UEA9 mod/C2-N-3389, UEA9 mod/HCO2198 a MyFi^{TM} mix s primery CPF4/CPR4, CPF4/C2-N-3389 nebyly získány žádné produkty (viz Obrázek 2).

Vznik více nespecifických produktů byl zaznamenán při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase s primery UEA9/C2-N-3389 a při použití MyFi^{TM} mix s primery C1-J1709/C2-N-3389 byly získány nespecifické produkty u dvou z pěti kontrolních vzorků (viz Obrázek 3).

MyTaq^{TM} DNA Polymerase byla použita pro amplifikaci fragmentů o předpokládané velikosti do cca 1 000 bp, pro fragmenty o předpokládané velikosti cca 2 000 bp byla použita MyFi^{TM} DNA Polymerase (MyFi^{TM} mix). Pro kombinaci primerů CPF4/CPR4 byly použity obě polymerázy, ale pozitivní výsledek byl zaznamenán pouze při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase. Při PCR amplifikaci s použitím MyFi^{TM} DNA Polymerase (MyFi^{TM} mix) nebyly získány žádné produkty (viz Obrázek 2) nebo vznikly nespecifické produkty (viz Obrázek 3B).

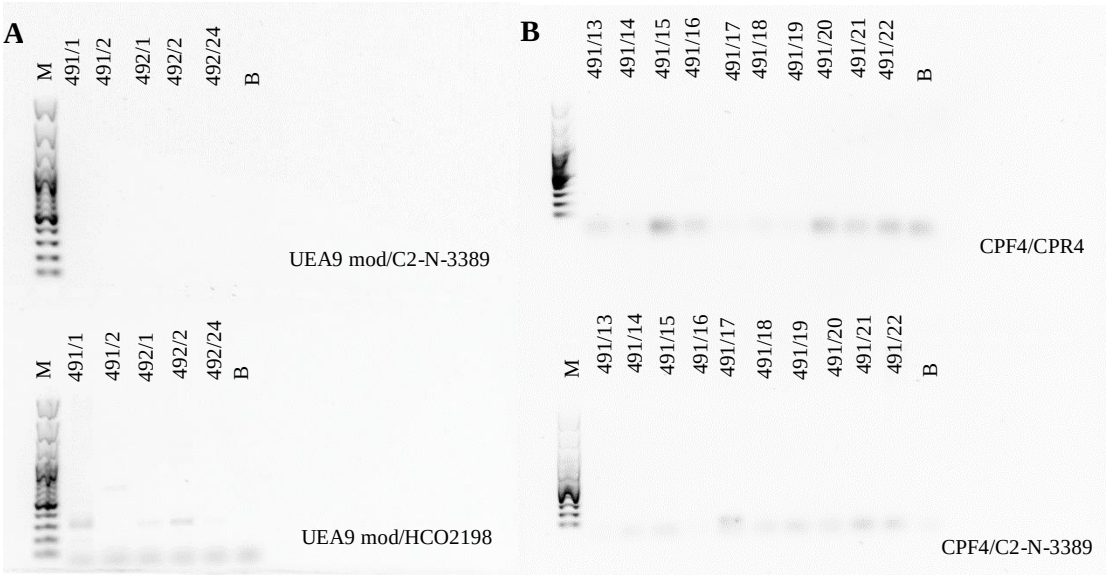
Na základě tohoto zjištění byla pro analýzu genetické variability zvolena kombinace primerů CPR4/CPF4 (podle Kang a kol., 2012) a její amplifikace pomocí MyTaq^{TM} DNA Polymerase.

Obrázek 1 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) C1-J1709/HCO2198 a (B) CPF4/CPR4 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase.



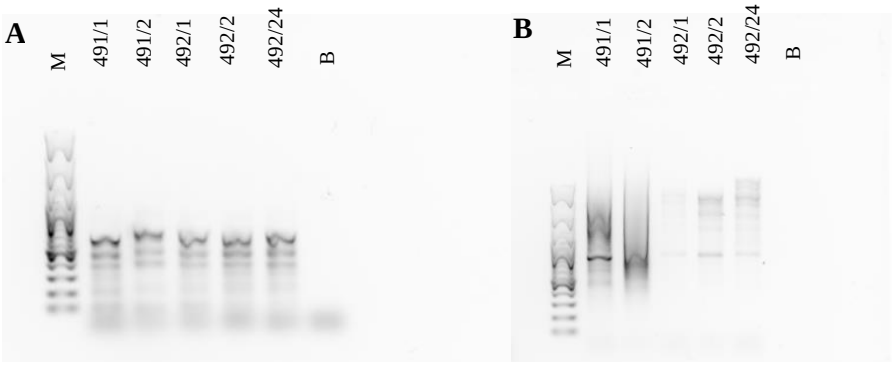
Legenda: (M): GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, (B): negativní kontrola, vzorky označeny čísly izolace.

Obrázek 2 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) UEA9 mod/C2-N-3389 a UEA9 mod/HCO2198 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase a (B) CPF4/CPR4 a CPF4/C2-N-3389 při použití MyFi^{TM} mix.



Legenda: (M): GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, (B): negativní kontrola, vzorky označeny čísly izolace.

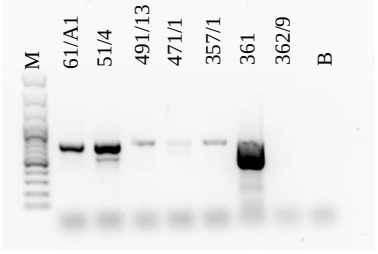
Obrázek 3 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery (A) UEA9/C2-N-3389 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase a (B) C1-J1709/C2-N-3389 při použití MyFi^{TM} mix.



Legenda: (M): GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, (B): negativní kontrola, vzorky označeny čísly izolace.

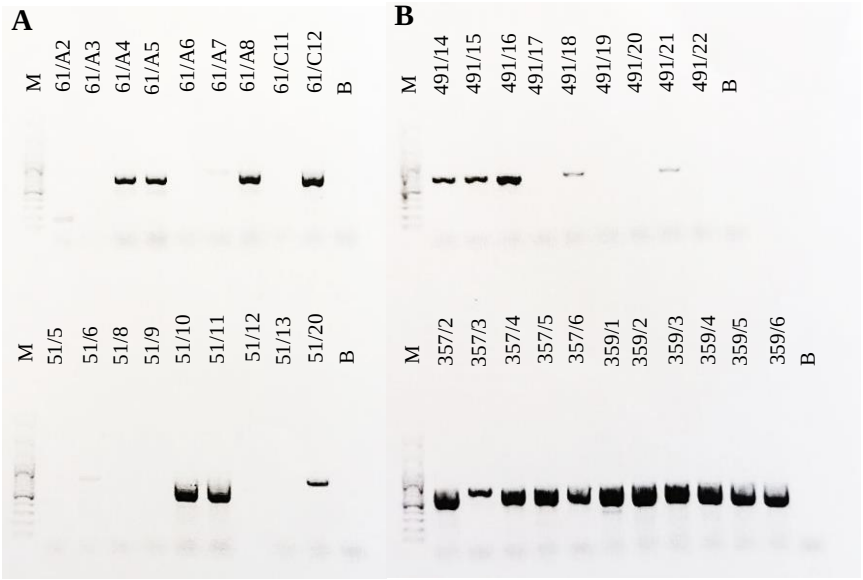
Po optimalizaci bylo zjištěno, že pro amplifikaci COI genu mitochondriální DNA mery *Cacopsylla picta* se jako nejvhodnější jeví použití primerů CPF4/CPR4 (podle Kang a kol., 2012). S těmito primery byla provedena PCR amplifikace 45 testovaných vzorků, které pocházely ze čtyř různých lokalit (Kozov, Brno-Starý Lískovec, Velké Bílovice a Drahanská vrchovina). Amplikony o očekávané velikosti cca 700 bp byly získány pouze u 64 % vzorků (viz Obrázek 4 a 5). 100% úspěšnost byla u vzorků, které pocházely z lokality Drahanská vrchovina (vzorky 357/1–6; 359/1–6 a 361); naopak nejnižší byla u vzorků pocházejících z lokality Brno-Starý Lískovec (vzorky 51), kde byly amplikony získány pouze u čtyř z deseti testovaných vzorků.

Obrázek 4: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s primery CPF4/CPR4 při použití MyTaq^{TM} DNA Polymerase.



Legenda: (M): GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, (B): negativní kontrola, vzorky označeny čísly izolace.

Obrázek 5 A, B: Oblast COI-tRNA^{leu}-COII mitochondriální DNA amplifikovaná pomocí PCR s použitím primerů CPF4/CPR4 a MyTaq^{TM} DNA Polymerase.



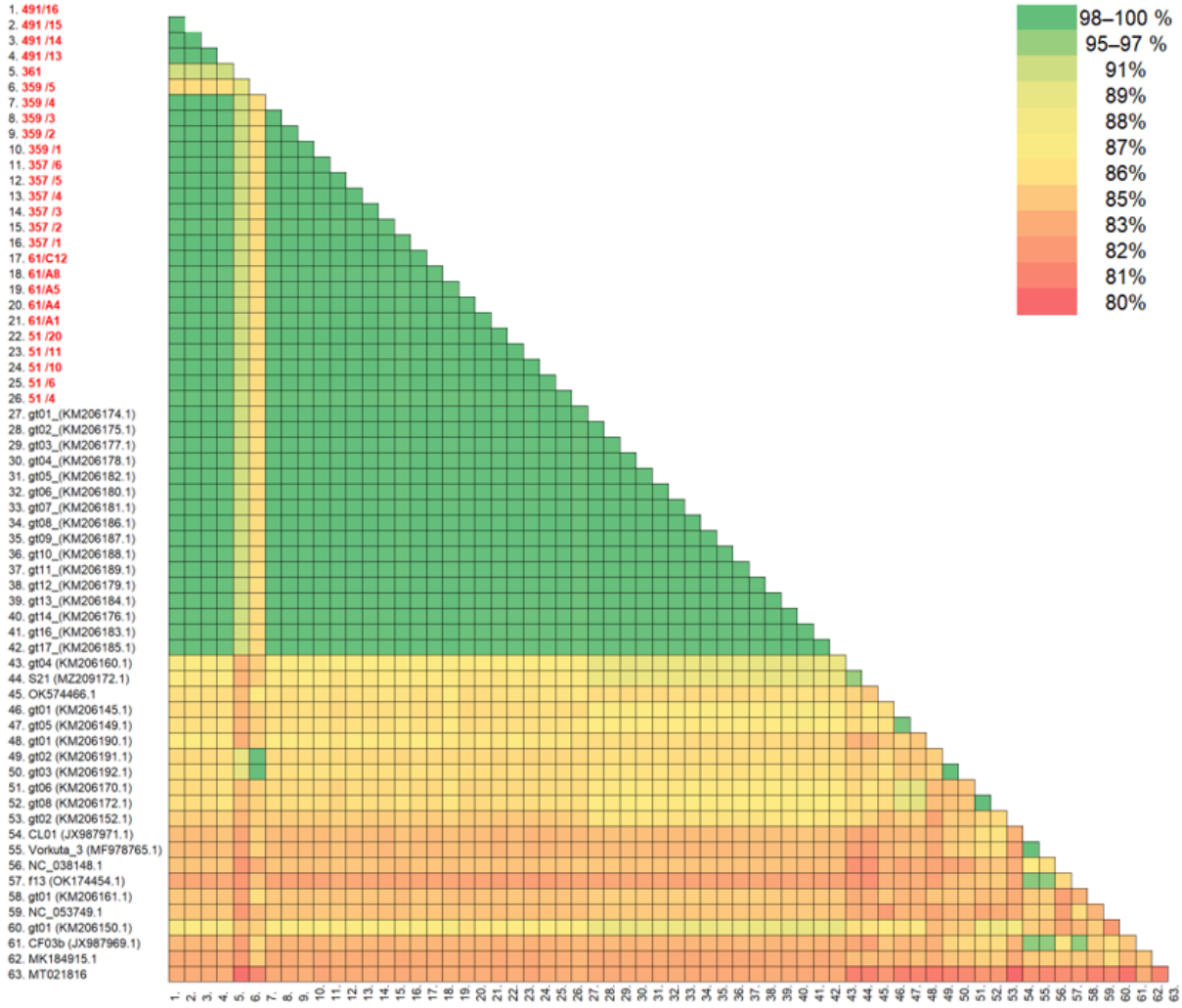
Legenda: (M): GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder, (B): negativní kontrola, vzorky označeny čísly izolace.

5.2 Fylogenetická analýza a analýza genetické variability COI fragmentu

Pomocí Sangerova sekvenování CPF4/CPR4 PCR amplikonů byly získány parciální COI sekvence o délce 500–700 bp u 26 jedinců *Cacopsylla picta*.

Metodou p-distance byla vyhodnocena identita studovaných vzorků (viz Obrázek 7). Z této analýzy vyplývá, že většina vzorků vykazovala 99–100% identitu se zástupci *Cacopsylla picta* získanými z databáze GenBank. Vzorky 361 a 359/5 se od ostatních studovaných vzorků lišily. Vzorek 361 vykazoval se zástupci *Cacopsylla picta* identitu 91 %, se zástupci *Cacopsylla pruni* a izolátem 359/5 vykazoval 89% identitu a se zástupci jiných druhů rodu *Cacopsylla* vykazoval tento vzorek identitu 82–85 %. Bylo zjištěno, že vzorek 359/5 vykazoval se zástupci *Cacopsylla picta* identitu pouze 86–87 %, zatímco s genotypy gt02 a gt03 *Cacopsylla pruni* vykazoval 100% identitu, s genotypem gt01 *Cacopsylla pruni* ale vykazoval pouze 86% identitu. Pomocí programu BLASTN byla provedena analýza vzorku 359/5, kdy bylo zjištěno, že sekvence vykazovala 99,51–99,84% identitu s výše zmíněnými genotypy gt02 a gt03.

Obrázek 6: P-distance analýza identity parciálních sekvencí COI genu u zástupců mer rodu *Cacopsylla*.



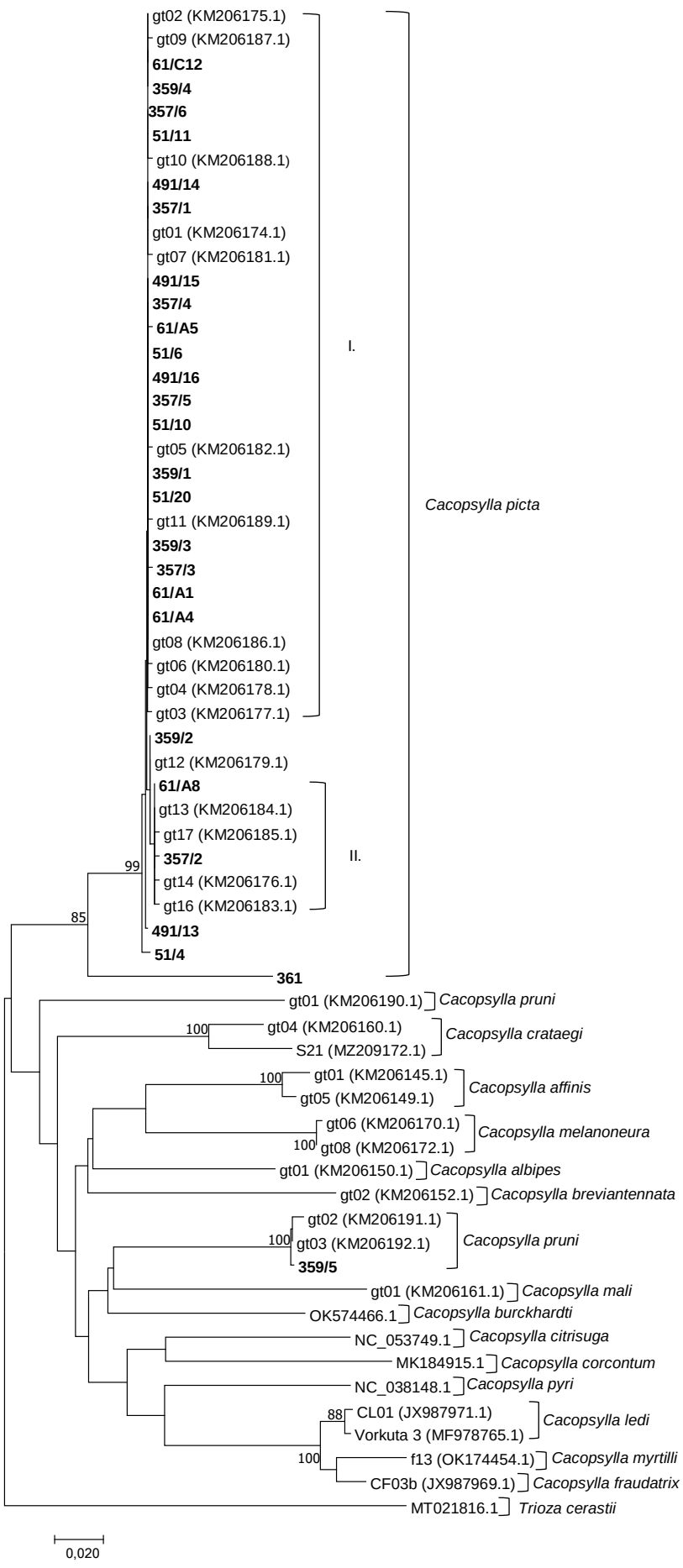
Legenda: Sekvence *Cacopsylla picta* v této práci označeny číslem sběru, červeně a tučně, sekvence mer získané z databáze GenBank označeny genotypem a accesion number. Barevná škála reprezentuje procentuální identitu nukleotidových sekvencí.

Porovnáním analyzovaných sekvencí studovaných vzorků se sekvencemi mer dostupnými v databázi GenBank bylo pomocí fylogenetické analýzy a Neighbor-joining metody zjištěno, že se analyzované sekvence vyvětvily do dvou hlavních skupin; a jedna sekvence se ale vyvětvila do skupiny se sekvencemi původem z jiného druhu rodu *Cacopsylla, C. pruni* (viz Obrázek 6).

Podle očekávání se většina analyzovaných sekvencí vyvětvila do první statisticky průkazné skupiny, společně s izoláty *Cacopsylla picta* původem z Itálie. V této skupině se vytvořily dva klastry, sekvence 61/C12, 359/4, 357/6, 51/11, 491/14, 491/15, 357/4, 61/A5, 51/6, 491/16, 357/5, 51/10, 359/1, 51/20, 359/3, 357/3, 61/A1 a 61/A4 vytvořily první klastr

a sekvence 61/A8 a 357/2 vytvořily druhý klastr. Sekvence 491/13 a 51/4 každá vytvořily samostatnou statisticky průkaznou větev, příbuznou s izoláty *Cacopsylla picta* z databáze GenBank původem z Itálie. Analyzovaná sekvence 361 se vyvětvila do samostatné statisticky průkazné větve, která vykazovala vyšší příbuznost s analyzovanými zástupci z první větve a se zástupci *Cacopsylla picta* původem z Itálie než se zástupci jiných druhů rodu *Cacopsylla*. Analýza variabilních oblastí sekvence 361 provedená v programu MEGAX, prokázala, že tato sekvence obsahovala 27 záměn nukleotidů, které jiné sekvence zástupců *Cacopsylla picta* z databáze neobsahovaly. Tato sekvence například v pozici 240 obsahovala C na rozdíl od zástupců *Cacopsylla picta* z databáze, kteří v této pozici obsahovaly T. Další záměna byla pozorována například v pozici 327, a to T→A, nebo v pozici 570 T→C. Většina těchto záměn byla pozorována i u sekvence 359/5. Sekvence 359/5 se vyvětvila společně s genotypy gt02 a gt03 jedinců *Cacopsylla pruni* původem z Itálie, čemuž odpovídají i předchozí zjištění pomocí p-distance analýzy.

Obrázek 7: Fylogenetický strom zástupců mer *Cacopsylla picta* a dalších zástupců vektorových mer anebo mer vyskytujících se na území ČR, sestavený na základě Neighbor-joining analýzy parciální sekvence COI genu. Zobrazeny hodnoty bootstrap ≥70, úsečka znázorňuje 0,02 substituci na pozici. (*C. picta* v této práci označeny tučně číslem sběru, sekvence mer získané z databáze GenBank označeny genotypem a accesion number).



6. DISKUSE

Proliferace jabloně (AP), jejímž původcem je ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, je významnou chorobou rostlin v Evropě způsobenou fytoplazmou (Seemüller a Schneider, 2004). V České republice, kde byla proliferace jabloně poprvé pozorována v 60. letech 20. století (Blattný a kol., 1963), je jejím hlavním vektorem mera *Cacopsylla picta,* k jejíž identifikaci a odlišení od ostatních druhů rodu *Cacopsylla* je možné využít metodu PCR-RFLP založenou na variabilitě genu kódujícího podjednotku I cytochrom c oxidázy (Oettl a Schlink, 2015).

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na molekulárně genetickou charakteristiku vektora fytoplazmy proliferace jabloně *Cacopsylla picta,* bioinformatickou analýzu a porovnání získaných sekvencí studovaných vzorků se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank.

Bylo pracováno se 45 vzorky mer *Cacopsylla picta* pocházejícími ze čtyř lokalit na Moravě (Kozov, Brno-Starý Lískovec, Velké Bílovice a Drahanská vrchovina), kde byly sběry provedeny v různých letech (2005, 2008, 2012 a 2015). Tato skutečnost mohla mít za následek, že amplifikací COI genu mitochondriální DNA byly dostatečně silné PCR produkty získány pouze u 26 vzorků. Amplikony o očekávané velikosti cca 700 bp byly získány u 100 % vzorků, které pocházely z roku 2008 a 2012, u 60 % vzorků z roku 2015 a pouze u 45% vzorků pocházejících z roku 2005.

Vzhledem k předpokládanému překryvu získaných amplikonů byly pro amplifikaci COI genu mitochondriální DNA zvoleny primery CPF4/CPR4 (podle Kang a kol., 2012) a jejich amplifikace pomocí MyTaq^{TM} DNA Polymerase. Ale vzhledem k tomu, že byly získány PCR produkty o velikosti cca 500 bp při amplifikaci pomocí primerů C1-J1709/HCO2198, by do budoucna bylo ke studiu variability vhodné použití také této kombinace primerů.

V další části bakalářské práce byla metodou p-distance vyhodnocena variabilita studovaných vzorků. Porovnáním analyzovaných sekvencí se sekvencemi *Cacopsylla picta* původem z Itálie byla zjištěna 99–100% identita v COI nukleotidové sekvenci. Toto zjištění je v souladu s prací Oettl a Schlink (2015), ve které autoři provedli PCR-RFLP analýzu COI genu mitochondriální DNA zástupců *Cacopsylla picta* a poté pomocí fylogenetické analýzy zjistili, že jejich vnitrodruhová sekvenční identita byla 98 %. Bylo také zjištěno, že námi studované sekvence jedinců *Cacopsylla picta,* pocházející z České republiky, se od zástupců pocházejících z Itálie nijak výrazně nelišily.

Fylogenetickou analýzou COI genu bylo zjištěno, že se analyzované sekvence vyvětvily do dvou hlavních skupin a sekvence 359/5 se vyvětvila do skupiny s jiným druhem rodu *Cacopsylla* a to se zástupci *Cacopsylla pruni*. Je zde patrná variabilita genu pro COI, protože sekvence *Cacopsylla picta* z databáze GenBank vytvořily dva klastry. Tyto klastry jsou v souladu s prací Oettl a Schlink (2015) a většina námi analyzovaných sekvencí pocházejících z České republiky se díky pozorované genetické variabilitě mezi tyto dva klastry rozdělila. Variabilita genu pro COI je ale zřejmě vyšší, protože byla identifikována jedna sekvence, genotyp 361, získaná z mery původem z lokality Drahanská vrchovina, která se významně lišila a vyvětvila se do samostatné statisticky průkazné větve, kde ovšem vykazovala jasnou příbuznost s ostatními zástupci *Cacopsylla picta*.

Odlišení na základě morfologických znaků, používaných odborníky a profesionálními entomology bývá velmi náročné, a v některých stádiích, i v souvislosti s pohlavím jedince, také velmi obtížné. Proto může docházet k chybné identifikaci jedinců a k jejich zařazení do nesprávného druhu rodu *Cacopsylla*. Tato skutečnost se potvrdila i u vzorku 359/5, původem z lokality Drahanská vrchovina. Sekvence COI z tohoto jedince (samice) vykazovala 86–87% identitu s jedinci *Cacopsylla picta*, ale 100% identitu s genotypy gt02 a gt03 *Cacopsylla pruni*. Fylogenetickou analýzou bylo zjištěno, že se tato sekvence vyvětvila do skupiny *C. pruni* (společně s genotypy gt02 a gt03). Vzhledem k tomuto společnému vyvětvení a jasné příslušnosti do fylogenetické větve *C. pruni* je vysoce pravděpodobné, že byl jedinec chybně identifikován a že se nejedná o samici mery *Cacopsylla picta*, ale *Cacopsylla pruni*. Toto zjištění jen potvrzuje vhodnost použití metody analýzy COI pro identifikaci sporných jedinců anebo jejich reklasifikaci. Tato skutečnost byla i několikrát potvrzena, například pomocí morfologické analýzy došlo k chybnému určení jedinců mer, kdy byl vzorek identifikován jako *Cacopsylla breviantennata*. Ale provedením PCR-RFLP analýzy COI genu mitochondriální DNA a následným porovnáním sekvence tohoto vzorku se sekvencí *Cacopsylla pyri* z databáze GenBank bylo prokázáno, že vzorek vykazoval 99,3% identitu se sekvencí *Cacopsylla pyri* a jednalo se tedy o zástupce *C. pyri* (Oettl a Schlink, 2015). Špatná entomologická identifikace byla prokázána i u několika novozélandských merul, kdy došlo k jejich nesprávnému určení a taxonomickému zařazení - *Trioza subacuta* byla nesprávně určena jako *Trioza subvexa* a to kvůli tomu, že byla nalezena na oleárii místo na její obvyklé hostitelské rostlině (*Brachyglottis*) (Martoni a kol., 2018). Dalším příkladem použití metody analýzy COI pro reklasifikaci sporných jedinců, bylo použití čtyř mitochondriálních genových fragmentů (COI 658 bp, COI 403 bp, COI-tRNA^{leu}-COII 580 bp a 16S rDNA 452 bp) k analýze chybně identifikovaných druhů *Cacopsylla* uvedených v databázi GenBank. Bylo zjištěno, že například sekvence

Cacopsylla pyricola původem z Koreje uvedené v databázi GenBank, Ac. No. JF327670–327679, JF327680–327689, JF327690–327692, JF327694–327699, JF327700–327709 (Kang a kol., 2012) ve fragmentu COI nevykazovaly významné odchylky od *Cacopsylla jukyungi*, ale od evropských vzorků *Cacopsylla pyricola* se lišily významně. Dále byla například zjištěna chybná identifikace u sekvencí *Cacopsylla pyrisuga* původem z Japonska uvedených v databázi GenBank, Ac. No. AB721007–721010 (Katoh a kol., 2013), která podle provedené analýzy vykazovala vysokou podobnost se vzorky *Cacopsylla burckhardti* původem z Koreje (Cho a kol., 2020).

7. ZÁVĚR

Fytoplazma proliferace jabloně, kterou způsobuje ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, je původcem významné choroby rostlin v Evropě. Hlavními přenašeči fytoplazmy proliferace jabloně jsou *Cacopsylla picta* a *Cacopsylla melanoneura* (Seemüller a Schneider, 2004). Morfologická identifikace mer je i v souvislosti s pohlavím jedince velmi obtížná a může tak docházet k chybné identifikaci jedinců a k jejich zařazení do nesprávného druhu rodu *Cacopsylla*. Z tohoto důvodu se diskutuje o možnosti použití molekulárních technik a determinaci.

V rámci experimentální části bakalářské práce byla provedena molekulárně genetická charakteristika mery *Cacopsylla picta*, vektora fytoplazmy proliferace jabloně. Bylo pracováno se 45 vzorky mer *Cacopsylla picta* pocházejícími ze čtyř lokalit na Moravě.

Pomocí Sangerova sekvenování CPF4/CPR4 PCR amplikonů byly získány parciální COI sekvence u 26 jedinců *Cacopsylla picta* o délce cca 700 bp. Metodou p-distance byla vyhodnocena identita studovaných vzorků. U většiny vzorků byla zjištěna 99–100% identita v COI nukleotidové sekvenci se sekvencemi *Cacopsylla picta* původem z Itálie získanými z databáze GenBank. Poté byla provedena fylogenetická analýza, při které se analyzované sekvence vyvětvily do dvou hlavních skupin.

Metodou p-distance bylo zjištěno, že se vzorek 361 lišil od ostatních a se zástupci z Itálie vykazoval pouze 91% identitu. Pomocí fylogenetické analýzy se následně sekvence 361 vyvětvila do samostatné statisticky průkazné větve, kde ovšem vykazovala jasnou příbuznost s ostatními zástupci *Cacopsylla picta*.

Další odlišnosti během p-distance metody byly zjištěny u vzorku 359/5, který vykazoval se zástupci *Cacopsylla picta* identitu 86–87 %, zatímco s genotypy gt02 a gt03 *Cacopsylla pruni* vykazoval 100% identitu. Pomocí fylogenetické analýzy se sekvence 359/5 vyvětvila do skupiny s jiným druhem rodu *Cacopsylla* a to se zástupci *Cacopsylla pruni*. Bylo zjištěno, že vzorek 359/5, původem z lokality Drahanská vrchovina byl chybně identifikován a jednalo se o samici *Cacopsylla pruni*.

Na základě zjištěných výsledků je patrné, že analýza COI genu je vhodnou metodou pro identifikaci neznámých jedinců anebo v případě sporných jedinců a identifikací k jejich reklasifikaci.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Acikgoz S. (1989). Tuber, graft and dodder transmission of potato disease caused by mycoplasmalike organisms (MLO) in Erzurum region. The Journal of Turkish Phytopathology 18: 31–38.

Adams A. N., Davies D. L., Kirby M. J. (2001). Virus and phytoplasma detection in fruit trees. Outlook Agri

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 (2): 53–73.

Andersen M. T., Beever R. E., Gilman A. C., Liefting L. W., Balmori E., Beck D. L., Sutherland P. W., Bryan G. T., Gardner R. C., Forster R. L. S. (1998). Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. Plant Pathology 47: 188–196.

Andersen M. T., Liefting L. W., Havukkala I., Beever R. E. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of ˈ*Candidatus* Phytoplasma australiense' reveals genome plasticity. BMC Genomics 14: 529.

Arashida R., Kakizawa S., Hoshi A., Ishii Y., Jung H. J., Kagiwada S., Yamaji Y., Oshima K., Namba S. (2008). Heterogeneic dynamics of the structures of multiple gene clusters in two pathogenetically different lines originating from the same phytoplasma. DNA and Cell Biology 27: 209–217.

Avinet L., Llácer G. (1995). Detection of phytoplasmas in fruit trees by polymerase chain reaction (PCR) in Spain. In: Acta Horticulturae 386: 480–483.

Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S. A., Radek A. J., Shevchenko D. V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J. W., Hogenhout S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. Journal of Bacteriology 188: 3682–3696.

Baric S., Berger J., Cainelli C., Kerschbamer C., Letschka T., Dalla Via J. (2011). Seasonal colonisation of apple trees by ˈ*Candidatus* Phytoplasma mali' revealed by a new quantitative TaqMan real time PCR approach. European Journal of Plant Pathology 129: 455–467.

Baric S., Kerschbamer C., Dalla Via J. (2007). Detection of latent apple proliferation infection in two differently aged apple orchards in South Tyrol (northern Italy). Bulletin of Insectology 60: 265–266.

Barthel D., Schuler H., Galli J., Borruso L., Geier J., Heer K., Burckhardt D., Janik K. (2020). Identification of plant DNA in adults of the phytoplasma vector *Cacopsylla picta* helps understanding its feeding behavior. Insects 11(12): 835.

Berg M., Davies D. L., Clark M. F., Vetten H. J., Maie G., Marcone C., Seemüller, E. (1999). Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. Microbiology 145 (8): 1937–1943.

Bernasconi M. V., Pawlowski J., Valsangiacomo C., Piffaretti J. C., Ward P. I. (2000). Phylogeny of the *Scathophagidae* (Diptera, Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 16: 308–315.

Bertaccini A. (2007), Phytoplasma: diversity, taxonomy, and epidemiology, Frontiers in Bioscience 12: 673–689.

Bertaccini A., Oshima K., Kube M., Rao G. P. (2019), Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-III., Springer Nature Singapore, 106–108.

Bertamini M., Muthuchelian K., Grando M., Nedunchezhian N. (2002). Effect of phytoplasma infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple (*Malus pumila* Mill. Cv. Golden Delicious), Photosynthetica 40: 157–160.

Bhat A. I., Siljo A., Deeshma K. P. (2013). Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Journal of Virological Methods 193: 190–196.

Blattný C. Jr., Seidl V., Erbenová M. (1963). The apple proliferation of various sorts and possible strain differentiation of viruses. Phytopathologia Mediterranea 2 (3): 119–123.

Blažek J., Vávra R., Kučerová J. (2005). Analysis concerning the rapid spread of apple proliferation phytoplasmas in a breeding orchard of apple seedlings. Horticultural Science 32 (2): 43–49.

Bliefernicht K., Krczal G. (1995). Epidemiological studies on apple proliferation disease in southern Germany. Acta Horticulturae 386: 444–447.

Blystad D. R., Toppe B., Holst M. A., Brurberg M. B. (2012). Survey for apple proliferation in orchards close to nurseries in Norway in 2011. In Book of Abstracts of the 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops 98.

Bonas U. (1994). *Hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Current Topics of Microbiological Immunology 192: 79–98.

Bovey R. (1963). Observations and experiments on apple proliferation disease. Phytopathologia Mediterranea 2 (3): 111–114.

CABI. (2021). Crop protection compendium: global module. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK.

CABI/EPPO (2013). ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. [Distribution map]. In: Distribution Maps of Plant Diseases, Wallingford, UK. CABI International. Doi: 10.1079/DMPD/20133421479.

Carraro L., Ermacora P., Loi N., Osler R. (2004). The recovery phenomenon in apple proliferation infected apple trees. Journal of Plant Pathology 86 (2): 141–146.

Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N. (2008). Infectivity of *Cacopsylla picta* (Syn. *Cacopsylla costalis*), ector of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in North East Italy. Acta Horticolturae 781: 403–408.

Carraro L., Osler R., Loi N., Favali M. A. (1991). Transmission characteristics of the clover phyllody agent by dodder. Journal of Phytopathology 133: 15–22.

Carraro L., Osler R., Refatti E., Poggi P. C. (1988). Transmission of the possible agent of apple proliferation to *Vinca rosea* by dodder. Rivista di Patologia Vegetale 24 (4): 43–52.

Casati P., Quaglino F., Tedeschi R., Spiga M. F., Alma A., Spadone P., Bianco P. A. (2010). Identification and molecular characterization of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ isolates in North-western Italy. Journal of Phytopathology 158: 81–87.

Cieślińska M., Borisova A. (2019). Molecular characterization of ˈ*Candidatus* phytoplasma maliˈ strains from Bulgaria and Poland. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 18 (5): 181–188.

Cieślińska M., Hennig E., Kruczyńska D., Bertaccini A. (2015). Genetic diversity of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ strains in Poland. Phytopathol. Mediter 54 (3): 477–487.

Credi R., Santucci A. (1992). Dodder transmission of mycoplasma-like organisms (MLOs) from grapevines affected by a flavescence dorée-type disease to periwinkle. Phytopathologia Mediterranea 31: 154–162.

Čermák V., Lauterer P. (2008). Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect to the vectors of the apple proliferation cluster phytoplasmas. Bulletin of Insectology 61 (1): 147-148.

Davies D. L., Stickels J. E., Adams A. N. (1986). A single occurrence of apple proliferation disease in England. Plant Pathology 35 (3): 400–402.

Davis R. E., Zhao Y., Wei W., Dally E. L., Lee I. M. (2017). ˈ*Candidatus* Phytoplasma luffaeˈ, a novel taxon associated with witches' broom disease of loofah, Luffa aegyptica Mill. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67: 3127–3133.

Deeley J. W., Stevens A., Fox R. T. V. (1979). Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. Phytopathology 69: 1169–1171.

Delic D., Martini M., Ermacora P., Carraro L., Myrta A. (2005). First report of fruit tree phytoplasmas and their psyllid vectors in Bosnia and Herzegovina. Journal of Plant Pathology 87 (2): 150.

Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulownia witches' broom. Annals of the Phytopathological Society of Japan 33: 259–266.

EPPO (1997). Apple proliferation phytoplasma. In: Smith, McNamara, Scott, Holderness, and Burger (eds.) Quarantine Pests for Europe II. CABI and EPPO Publishing. 959–962.

EPPO (2021). EPPO Global database. In: EPPO Global database. https://gd.eppo.int/taxon/PHYPMA [listopad 2021].

Etropolska A., Jarausch W., Jarausch B., Trenchev G. (2015). Detection of European fruit tree phytoplasmas and their insect vectors in important fruit-growing re-gions in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science 21: 1248–1253.

Fialová R., Navrátil M., Válová P. (2003). Phytoplasma occurrence in apple trees in the Czech Republic. Plant Protection Science 39: 7–12.

Firrao G., Gobbi E., Locci R., (1993). Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasmalike organisms. Phytopathology 83 (6): 602–607.

Folmer O., Black B. M., Hoeh Wr., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3: 294–9.

Fránová J., Ludvíková H., Paprštein F., Bertaccini A. (2013). Genetic diversity of Czech ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ strains based on multilocus gene analyses. European Journal of Plant Pathology 136: 675–688.

Frisinghelli C., Delaiti M., Grando S., Forti D., Vindimian E. (2000). *Cacopsylla costalis* (Flor 1861) as a vector of apple proliferation in Trentino. Journal of Phytopathology 148: 425–431.

Glass J. I., Lefkowitz E. J., Glass J. S., Heiner C. R., Chen E. Y., Cassell G. H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. Nature 407 (6805): 757–762.

Görg L. M., Gallinger J., Gross, J. (2021). The phytopathogen ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ alters apple tree phloem composition and affects oviposition behavior of its vector *Cacopsylla picta*. Chemoecology 31: 31–45.

Gundersen D. E., Lee I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer sets. Phytopathologia Mediterranea 35: 144–151.

Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Katinger H., Bertaccini A., Laimer da Câmara Machado M. (2001). Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. Plant Molecular Biology Reporter 19: 169–179.

Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 1826–1837.

Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar E. D., Kakizawa S., Kingdom H. N., Namba S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology 9 (4): 403–423.

Chang F. L., Chen C. C., Lin C. P. (1995). Monoclonal antibody for the detection and identification of a phytoplasma associated with rice yellow dwarf. European Journal of Plant Pathology 101 (5): 511–518.

Chiykowski L. N. (1991). Vector-pathogen host plant relationships of clover phyllody mycoplasmalike organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. Canadian Journal of Plant Pathology 13: 11–18.

Cho G., Malenovský I., Burckhardt D., Inoue H., Lee S. (2020). DNA barcoding of pear psyllids (Hemiptera: Psylloidea: Psyllidae), a tale of continued misidentifications. Bulletin of Entomological Research, 1–14.

Christensen N. M., Nyskjold H., Nicolaisen M. (2012). Real-Time PCR for Universal Phytoplasma Detection and Quantification. Phytoplasma. In: Dickinson M., Hodgetts J. (eds) Phytoplasma. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 938. Humana Press, Totowa, NJ. 245–252.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004). ˈ*Candidatus* Phytoplasmaˈ, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that 53 colonise plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1243–1255.

Ito K., Akiyama Y. (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. Annual Review of Microbiology 59: 211–231

Janik K., Barthel D., Oppedisano T., Anfora G., Angeli G., Baldessari M., Bianchedi P. L., Campisano A., Covelli L. T., Dallago G., Fischnaller S., Ioriatti C., Jarausch W., Letschka T., Mazzoni V., Mittelberger C., Moser M., Öttl S., Panassiti B., Weil T. (2020). Apple Proliferation - a Joint Review.

Jarausch B., Fuchs A., Schwind N., Krczal G., Jarausch W. (2007). *Cacopsylla picta* as most important vector for ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in Germany and neighbouring regions. Bulletin of Insectology 60: 189–190.

Jarausch B., Schwind N., Jarausch W., Krczal G., Seemüller E., Dickler E. (2003). First report of *Cacopsylla picta* as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. Plant Disease 87 (1): 101.

Jarausch W., Lansac M., Portanier C., Davies D. L., Decroocq V. (2000a). *In vitro* grafting: a new tool to transmit pome fruit phytoplasmas to non-natural fruit tree hosts. Advances in Horticultural Science 14: 32.

Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J. M., (1994). Differentiation of mycoplasmalike organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. In: Applied and Applied Environmental Microbiology 60 (8): 2916–2923.

Jarausch W., Saillard C., Helliot B., Garnier M., Dosba F. (2000b). Genetic variability of apple proliferation phytoplasma as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. Molecular and Cellular Probes 14: 17–24.

Jardim B. R., Kinoti W. M., Tran-Nguyen L. T. T., Gambley Ch., Rodoni B., Constable F. E. (2021). ˈ*Candidatus* Phytoplasma stylosanthisˈ, a novel taxon with a diverse host range in Australia, characterised using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *secA*, *tuf*, and *rp* genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 71: 004589.

Jollard C., Foissac X., Desqué D., Razan F., Garcion C., Beven L., Eveillard S. (2019). Flavescence dorée phytoplasma has multiple *ftsH* genes that are differentially expressed in plants and insects. International journal of molecular sciences 21 (1): 150.

Jomantiene R., Zhao Y., Davis R. E. (2007). Sequence-variable mosaics: Composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. DNA and Cell Biology 26 (8): 557–564.

Kaminśka M., Śliwa H. (2008a). Mixed infection of dahlia plants in Poland with apple proliferation and aster yellows phytoplasmas. Plant Pathology 57: 363.

Kaminśka M., Śliwa H. (2008b). First report of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in oriental lilies and its association with leaf scorch in Poland. Plant Pathology 57: 363.

Kaminśka M., Śliwa H., (2007). First report of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in oriental lilies and its association with leaf scorch in Poland. New Disease Reports. 363–363.

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.

Kang Ah R., Baek J. Y., Lee S. H., Cho Y. S., Kim W. S., Han Y. S., Kim I. (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 (2): 145–153.

Kartte S., Seemüller E. (1988). Variable response within the genus Malus to the apple proliferation disease. Journal of Plant Diseases and Protection 95 (1): 25–34.

Kartte S., Seemüller E. (1991). Susceptibility of grafted Malus taxa and hybrids to apple proliferation disease. Journal of Phytopathology 131: 137–148.

Katoh H., Inoue H., Kuchiki F., Ide Y., Uechi N., Iwanami T. (2013) Identification of a distinct lineage of *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) in Japan on the basis of two mitochondrial DNA sequences. Journal of Economic Entomology 106: 536–542.

Križanac I., Mikec I., Budinščak Ž., Musić M. Š., Škorić D. (2010). Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. Journal of Plant Diseases and Protection 117 (5): 206–213.

Kube M., Schneider B., Kuhl H., Dandekar T., Heitmann K., Migdoll A., Reinhard R., Seemüller E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. BMC Genomics 9: 306.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870–1874.

Kunze L. (1976). The effect of different strains of apple proliferation on the growth and crop of infected trees. Acta Horticulturae 67: 340–340.

Kunze L. (1989). Apple proliferation. In: Virus and Virus-like Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders, Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics. Pullmann, WA. Washington State University: 99–113.

Lauterer P. (1999). Results of investigations on Hemiptera in Moravia, made by Moravian Museum (Psylloidea 2). Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae 84: 71–151.

Lee I. M., Bertaccini A., Vibio M., Gunderson D. E. (1995). Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology 85: 728–735.

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: 1153–1169.

Lee I. M., Zhao Y., Bottner K. D. (2006). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. Molecular and Cellular Probes 20: 87–91.

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: 59–68.

Lin C. P., Chen T. A. (1986). Comparison of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in detection of aster yellows mycoplasma-like organism. Phytopathology 76.

Loi N., Carraro L., Musetti R., Firrao G., Osler R., (1995). Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. Journal of Phytopathology 143 (10): 581–584.

Loi N., Ermacora P., Carraro L., Osler R., Chen T. A. (2002). Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. European Journal of Plant Pathology 108 (1): 81–86.

Lorenz K. H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E., (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85 (7): 771–776.

Lunt D. H., Zhang D. X., Szymura J. M., Hewitt G. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Molecular Biology 5: 153–165.

Marcone C, Ragozzino A., Seemüller E (1997). Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). European Journal of Forest Pathology 27: 347–350.

Marcone C., Lee I. M., Davis R. E., Ragozzino A., Seemüller E. (2000). Classification of aster yellows group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1703–1713.

Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. Phytopathology 89: 805–810.

Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. (1996a). Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. Plant Pathology 45: 857–863.

Marcone C., Ragozzino A., Serrone P. del, Aloj B., Barba M., Seemüller E. (1996b). Detection of apple proliferation and pear decline in southern Italy. Petria 6 (2): 149–157.

Martini M., Ermacora P., Dělič D., Moruzzi S., Loi N., Carraro L. (2005). Spreading and characterization of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ subtypes in different growing areas. Petria 15: 105–107.

Martini M., Ermacora P., Falginella L., Loi N., Carraro L. (2008). Molecular differentiation of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ and its spreading in Friuli Venezia Giulia Region (north-east Italy). Acta Horticulturae 781: 395–402.

Martini M., Lee I. M., Bottner K. D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N. A., Carraro L., Marcone C., Khan J., Osler R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2037–2051.

Martoni F., Bulman S., Pitman A., Taylor G., Armstrong K. (2018). DNA barcoding highlights cryptic diversity in the New Zealand Psylloidea (Hemiptera: Sternorrhyncha). Diversity, 10 (3): 50.

Maszkiewicz J., Blaszczak W., Millikan D. F. (1980). Changes in phloridzin content, osmotic values of cellular sap, and cell wall thickness of apple leaf tissue associated with the proliferation disease. Phytopathologische Zeitschrift 99 (1): 33–36.

Mattedi L., Forno F., Branz A., Bragagna P., Battocletti I., Gualandri V., Pedrazzoli F., Bianchedi P. L., Deromedi M., Filippi M., Dallabetta N., Varner M., Ciccotti A. M. (2008a). Come riconoscere la malattia in campo: novità sulla sintomatologia. In: Ioriatti C., Jarausch W. (Eds.): Scopazzi del melo - Apple proliferation. San Michele all'Adige (TN): Fondazione Edmund Mach: 41–50.

Mattedi L., Forno F., Cainelli C., Grando M. S., Jarausch W. (2008b). Research on ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ transmission by insect vectors in Trentino. Acta Horticolturae 781: 369–374.

Matus J. T., Vega A., Loyola R., Serrano C., Cabrera S., Arce-Johnson P. (2008). Phytoplasma and virus detection in commercial plantings of *Vitis vinifera* cv. Merlot exhibiting premature berry dehydration. Electronic Journal of Biotechnology 11 (5): 7–8.

Mayer C. J., Vilcinskas A., Gross J. (2011) Chemically mediated multitrophic interactions in a plant insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. Agricultural and Forest Entomology 13: 25–35.

Mehle N., Brzin J., Boben J., Hren M., Frank J., Petrovič N., Gruden K., Dreo T., Žežlina I., Seljak G., Ravnikar M., (2007). First report of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. Plant Pathology 56 (4): 721.

Mitrović J., Kakizawa S., Duduk B., Oshima K., Namba S., Bertaccini A. (2011). The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of ˈ*Candidatus* Phytoplasma asterisˈ-related strains. Annals of Applied Biology 159 (1): 41–48.

Mittelberger C., Obkircher L., Oettl S., Oppedisano T., Pedrazzoli F., Panassiti B., Kerschbamer Ch., Anfora G., Janik K. (2016). The insect vector *Cacopsylla picta* vertically transmits the bacterium ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ to its progeny. Plant Pathology 66 (6): 1015–1021.

Moser M., Musetti R., Velasco R., Jarausch W. (2011). Gene expression analysis and cytochemical investigations in ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ- resistant and - susceptible *Malus* genotypes grown *in vitro*. Bulettin of Insectology 64 (Suplement): S161–S162.

Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Martini M., Paduano C., Osler R. (2011). Interactions between ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. Journal of Applied Microbiology 110 (3): 746–756.

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): 64.

Nagamine K., Hase T., Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 16: 223–229.

Navrátil M., Válová P., Fialová R., Fránová J., Voráčková Z., Karešová R. (1998). Occurrence of fruit tree phytoplasmas in the Czech Republic. Acta Horticulturae 472: 649–653.

Neimark H., Kirkpatrick B. C. (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. Molecular Microbiology 7: 21–28.

Nejat N, Vadamalai G. (2013). Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. Journal of Plant Diseases and Protection 120 (1): 16–25.

Németh M. (1986). Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees 463–479.

OEPP/EPPO (2020) PM 7/62 ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, ˈ*Ca.* P. pyriˈ and ˈ*Ca.* P. prunorumˈ.

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): 2174–83.

Oppedisano T., Panassiti B., Pedrazzoli F., Mittelberger C., Bianchedi P. L., Angeli G., De Cristofaro A., Janik K., Anfora G., Ioriatti C. (2019). Importance of psyllids' life stage in the epidemiology of apple proliferation phytoplasma. Journal of Pest Science 93: 49–61.

Orlovskis Z., Canale M. C., Haryono M., Lopes J. R. S., 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: 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: 27–29.

Osler R., Loi N., Carraro L., Ermacora P., Refatti E. (2000). Recovery in plants affected by phytoplasmas. Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Taormina, Italy. 589–592.

Ossiannilsson F. (1992). The psylloidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. In: Kristensen N. P., Michelsen V. (Eds.): Fauna Entomologica Scandinavica. Leiden (NL), New York (USA), Köln (D): Brill: 26-347.

Paltrinieri S., Duduk B., Dal Molin F., Comerlati G., Bertaccini A. (2010). Molecular characterization of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ strains in outbreaks of apple proliferation in north eastern Italy, Hungary and Serbia. Julius-Kühn-Archiv 427: 178–182.

Pastore M., Piccirillo P., Simeone A.M., Tian J., Paltrinieri S., Bertaccini A. (2001). Transmission by patch grafting of ESFY phytoplasma to apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl). Acta Horticulturae 550: 339–344.

Pedrazzoli F., Ciccotti A. M., Bianchedi P. L., Salvadori A., Zorer R. (2008). Seasonal colonisation behaviour of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ in apple trees in Trentino. Acta Horticolturae 781: 483–489.

Rid M., Mesca C., Ayasse M., Gross J. (2016). Apple proliferation phytoplasma influences the pattern of plant volatiles emitted depending on pathogen virulence. Frontiers in Ecology and Evolution 3 (67): 152.

Seemüller E. (1976). Investigation to demonstrate mycoplasma-like organism in diseased plants by fluorescence microscopy. Acta Horticulturae 67: 109–112.

Seemüller E. (1990). Apple proliferation. Jones A. L., Aldwinkel H. S. (Eds.): Compendium of apple and pear diseases. St. Paul, MN, USA: APS Press: 67–68.

Seemüller E. (2002). Apple proliferation: etiology, epidemiology and detection. In: Brunelli A., Canova A. (eds.). In: Proceedings Giornate Fitopatologiche, Vol. I, Baselga di Piné (Trento). 3–6.

Seemüller E., Carraro L., Jarausch W., Schneider B. (2011a). Apple Proliferation Phytoplasma. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (Eds): Virus and Virus-like diseases or Pome and Stone fruits: The American Phytopathological Society. 67–73.

Seemüller E., Garnier M., Schneider B. (2002). Mycoplasmas of plants and insects. In Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas. 91–116.

Seemüller E., Kampmann M., Kiss E., Schneider B. (2011b). *HflB* gene-based phytopathogenic classification of ˈ*Candidatus* phytoplasma maliˈ strains and evidence that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. Molecular Plant-Microbe Interactions 24 (10): 1258–1266.

Seemüller E., Kiss E., Sule S., Schneider B. (2010). Multiple infection of apple trees by distinct strains of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ and its pathological relevance. Phytopathology 100 (9): 863–870.

Seemüller E., Kunze L., Schaper U. (1984a). Colonization behaviour of MLO, and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. Journal of Plant Diseases and Protection 91 (5): 371–382.

Seemüller E., Moll E., Schneider B. (2008). Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. European Journal of Plant Pathology 121 (2): 109–119.

Seemüller E., Schaper U., Zimbelmann F. (1984b). Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasmalike organisms associated with apple proliferation and pear decline. Journal of Plant Diseases and Protection 91: 371–382.

Seemüller E., Schneider B. (2004). ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, ˈ*Candidatus* Phytoplasma pyriˈ and ˈ*Candidatus* Phytoplasma prunorumˈ, 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., Schneider B. (2007). Differences in virulence and genomic features of strains of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ, the apple proliferation agent. Phytopathology 97: 964–970.

Serrone P. del, Starza S., Krystai L., Kolber M., Barba M. (1998). Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. Journal of Plant Pathology 80 (1): 53–58.

Schaper U., Seemüller E. (1984). Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline diseased trees by the causal organisms in spring. Journal of Plant Diseases and Protection 91: 608–613.

Schmid G. (1975). Prolonged observations on spread and behaviour of proliferation disease in apple orchards. Acta Horticolturae (44): 183–192.

Schneider B., Seemüller E. (2009): Strain differentiation of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ by SSCP and sequence analyses of the *HflB* gene. Journal of Plant Pathology 91 (1): 103–112.

Simon C., Buckley T. R., Frati F., Stewart J. B., Beckenbach A. T. (2006). Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 37: 545–579.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Annals of the Entomological Society of America 87: 651–701.

Strauss E. (2009). Phytoplasma research begins to bloom. Science 325: 388–390.

Swenson K. G. (1974). Host plants and seasonal cycle of a leafhopper *Fieberiella florii* in Western Oregon. Journal of Economic Entomology 67 (2): 299–300.

Tedeschi R., Alma A. (2006). *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ. Plant Disease 90 (3): 284–290

Tedeschi R., Alma A. (2007). ˈ*Candidatus* Phytoplasma maliˈ: the current situation of insect vectors in northwestern Italy. Bulletin of Insectology 60 (2): 187–188.

Tedeschi R., Baldessari M., Mazzoni V., Trona F., Angeli G. (2012). Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae) in northeast Italy and its role in the apple proliferation epidemiology in apple orchards. Journal of Economic Entomology 105 (2): 322–328.

Tedeschi R., Bosco D., Alma A. (2002). Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. Journal of Economic Entomology 95 (3): 544–551.

Tedeschi R., Lauterer P., Brusetti L., Tota F., Alma A. (2009). Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorne psyllid fauna of northwestern Italy. European Journal of Plant Pathology 123: 301–310.

Tran-Nguyen L. T., Kube M., Schneider B., Reinhardt R., Gibb K. S. (2008). Comparative genome analysis of ˈ*Candidatus* Phytoplasma australiense' (subgroup *tuf*-Australia I; *rp-A*) and '*Ca*. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. Journal of Bacteriology 190: 3979–3991.

Valasevich N., Schneider B., (2016). Detection, identification and molecular diversity of ˈ*Candidatus* Phytoplasma prunorumˈ in Belarus. Journal of Plant Pathology 98 (3): 625–629.

Valiunas D., Jomantiene R., Davis R. E. (2013). Evaluation of the DNA-dependent RNA polymerase β-subunit gene (*rpoB*) for phytoplasma classification and phylogeny. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 3904–3914.

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: 689.

Weintraub P. G., Beanland L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology 51 (1): 91–111.

Wernegreen J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* (3): 850–861.