



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOČNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA,
UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA
MOLEKULÁRNÍ DETERMINACE
VEKTOROVÝCH DRUHŮ MER
NAPADAJÍCÍCH OVOCNÉ STROMY**

Radek Čmejla a kol.



**METODIKA
2023**



Autorský kolektiv:

RNDr. Radek Čmejla¹, Ph.D., Ing. Martina Rejlová¹, Ing. Jana Ouředníčková¹, Ph.D.,
Ing. Michal Skalský¹, Ph.D., prof. RNDr. Milan Navrátil², CSc., Mgr. Dana Šafářová², Ph.D.,
Ing. Jiří Sedlák¹, Ph.D.

¹VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Hořice

²Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

radek.cmejla@vsuo.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

kolektiv autorů

Odborný oponent:

Mgr. Igor Malenovský, Ph.D.

Oponent ze státní správy:

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D.

**Název: Certifikovaná metodika molekulární determinace vektorových druhů mer
napadajících ovocné stromy**

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QK21020395: Produkce fytoplazem prostých školkařských výpěstků a jejich ochrana před reinfekcí.

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

ISBN 978-80-87030-91-2 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/zgw3-5154>



OBSAH

1.	Úvod	4
2.	Cíl metodiky	4
3.	Vlastní popis metodiky	5
3.1	Popis systému pro molekulární determinaci mer.....	5
3.1.1	Návrh primerů a sond detekčního systému	5
3.1.2	Seznam primerů a sond použitých pro detekci <i>Cacopsylla</i> spp.	6
3.2	Postup determinace mer rodu <i>Cacopsylla</i> metodou real-time PCR	7
3.2.1	Pre-analytická fáze	7
3.2.2	Analytická fáze.....	7
3.2.2.1	<i>Izolace DNA</i>	7
3.2.2.2	<i>Real-time PCR detekce</i>	9
3.2.3	Post-analytická fáze.....	12
3.2.3.1	<i>Vyhodnocování, analýza dat</i>	12
3.2.4	Příklady využití systému pro determinaci mer ovocných stromů, interpretace výsledků	15
4.	Srovnání novosti postupů	18
5.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	19
6.	Ekonomické aspekty	19
6.1	Fytosanitární hledisko	19
6.2	Laboratorní hledisko	21
7.	Seznam použité související literatury	22
8.	Seznam publikací, které předcházely metodice	22

1. ÚVOD

Ochrana výsadeb ovocných dřevin před patogenními fytoplazmami a jejich vektory je založena na provádění preventivních opatření, mezi něž patří likvidace zdrojů fytoplazem a monitoring vektorů a případná ochrana proti nim v množitelských porostech a produkčních výsadbách. Mezi vektory přenášející fytoplazmy řadíme zástupce bodavě savého hmyzu, mer rodu *Cacopsylla*. *Cacopsylla picta* a *C. melanoneura* jsou přenašeči fytoplazmy proliferace jabloně ('*Candidatus Phytoplasma mali*'); *C. pruni* je vektorem fytoplazmy evropské žloutenky peckovin ('*Candidatus Phytoplasma prunorum*'), kterou šíří mezi hostitelskými rostlinami rodu *Prunus*; *C. pyri*, *C. pyricola* a *C. pyrisuga* jsou vektory fytoplazmy chřadnutí hrušně ('*Candidatus Phytoplasma pyri*'). *C. mali* sice saje na jabloních, nicméně fytoplazmu proliferace jabloně nepřenáší (Tedeschi a Alma 2004, Riedle-Bauer *et al.* 2022). V současnosti v podmínkách měnícího se klimatu je nutné aktualizovat informace o výskytu fytoplazmóz a jejich vektorů ve školkách i výsadbách ovocných dřevin. Ukazuje se, že vektorový druh, jeho infekčnost a genetická struktura populace ovlivňují epidemiologické cykly a následně i ekonomickou škodlivost fytoplazem. Protože infikované dřeviny není možné léčit, poskytuje monitoring vektorových druhů rodu *Cacopsylla* informace o přítomnosti přenašečů v ovocných školkách a produkčních výsadbách a umožňuje cílenou kontrolu jejich výskytu. Z toho důvodu je potřebná rychlá a spolehlivá identifikace vektorových druhů mer, které se vyskytují v ovocných porostech. Identifikace mer pomocí morfologických rozlišovacích znaků je problematická vzhledem k podobnosti některých druhů mer a může být náchylná k chybám. Metodika předkládá specifickou a rychlou metodu real-time PCR založenou na detekci oblasti mitochondriálního genu podjednotky I cytochrom oxidázy (COI) pro molekulární identifikaci šesti druhů rodu *Cacopsylla*, jakožto vektorů fytoplazmy (vyjma *C. mali*) vyskytujících se v produkčních sadech.

2. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout spolehlivý systém pro determinaci vybraných druhů rodu *Cacopsylla*, a to *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*, vektorů fytoplazem způsobujících onemocnění u ovocných dřevin. Navržená metodika je založena na principu real-time PCR a umožňuje molekulární determinaci šesti druhů mer běžně se vyskytujících v České republice. Determinační systém lze použít primárně pro určování druhů mer v ovocných sadech bez potřebných dlouholetých entomologických zkušeností, anebo pro potvrzení identifikace jedinců na základě specifických morfologických znaků. Metodiku lze také využít pro specifickou determinaci larválních stádií mer, jejichž identifikace je pouze na základě morfologických kritérií problematická. Využití metodiky se předpokládá zejména v rostlinolékařství – v odborech diagnostiky škodlivých organismů rostlin, dále pro vědecké a výzkumné účely v oblasti ochrany ovocných druhů vůči těmto vektorům. Díky včasné a správné identifikaci škůdců mohou být sadaři schopni minimalizovat nejenom produkční, ale i finanční ztráty. Dalším kladem je umožnění cíleného použití insekticidních přípravků na ochranu ovocných dřevin, a tedy možnost snížení jejich dopadu na životní prostředí.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů molekulárně-biologických metod a správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie. Metodika byla testována s použitím konkrétních reagensií, souprav a přístrojů (viz níže), odborník v oboru však bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře a používané laboratorní reagentie.

3.1 Popis systému pro molekulární determinaci mer

Metodika real-time PCR identifikace druhů rodu *Cacopsylla* má dva subsystémy – specifická detekce vybraných druhů mer a univerzální detekce mer. Specifická detekce umožňuje přímo určit šest druhů mer vyskytujících se v ovocných sadech: *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*. Systém univerzální detekce mer byl navržen tak, aby byla umožněna detekce doposud popsanych druhů mer rodu *Cacopsylla*, jejichž sekvence jsou uloženy v databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) nebo byly získány na pracovišti autorů. Univerzální detekční systém tedy slouží pro kontrolu kvality předcházejících procesů (homogenizace, izolace DNA, příprava PCR), protože by vždy měl poskytovat signál, pokud je předmětem analýzy skutečně mera rodu *Cacopsylla*. Mery, které nebyly identifikovány pomocí specifické detekce, mohou být stále determinovány následnou sekvenační analýzou COI genu.

Metodika je primárně určena pro determinaci jednoho jedince mery, případně více, u kterých se předpokládá, že jsou stejného druhu. Z principu lze metodiku také použít pro určování různých druhů mer ve směsi, pro tento účel však nebyla validována a potenciální uživatel si musí ověřit výkonnostní parametry metody.

3.1.1 Návrh primerů a sond detekčního systému

Specifická primery a sondy byla zajištěna ve třech krocích. Pro účely determinace mer byly vybrány pouze takové sondy a primery, které vykazovaly nejvyšší specifitu a nevedly k falešně pozitivním detekcím u necílových druhů během 35 PCR cyklů.

A) Specifická definovaná *in silico*

Prvotní analýzy měly za cíl najít takovou oblast pro návrh primerů a sond, která je i) specifická pro daný druh mery; ii) zároveň konzervovaná u daného druhu mery; a iii) dostatečně odlišná od všech ostatních necílových sekvencí. Pro analýzu byl vybrán gen podjednotky I cytochrom oxidázy (COI), který se běžně využívá pro fylogenetické studie a k molekulární identifikaci (tzv. DNA-barcoding) živočichů, a k dispozici je tak rozsáhlá sbírka sekvencí z mnoha druhů včetně zástupců rodu *Cacopsylla*.

Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza dostupných sekvencí u *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* a dalších druhů rodu *Cacopsylla*. Při výběru vhodné cílové oblasti v tomto genu se primárně přihlíželo k tomu, aby tento úsek byl specifický pro daný druh *Cacopsylla*. Navržená oblast byla dále analyzována pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) s cílem zjistit homologii této oblasti u příbuzných

i nepříbuzných druhů hmyzu. V definovaných oblastech bylo poté navrženo několik zkušebních párů primerů (software Geneious Prime; Biomatters Ltd.).

B) Specificita ověřená na syntetických standardech

Pro vybrané druhy mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* byly navrženy syntetické standardy, které mají stejnou sekvenci jako cílové místo pro PCR amplifikaci. Pomocí těchto syntetických standardů (typ Ultramer®; Integrated DNA Technologies, Inc.) byla ověřena specificita navržených primerů a sond a byly optimalizovány reakční podmínky.

C) Specificita ověřená na vzorcích rodu *Cacopsylla*

V dalším kroku byla specificita primerů otestována na souboru 176 vzorků mer, který zahrnoval jak cílové druhy, tak i jiné zástupce mer (např. *C. brunneipennis*, *C. crataegi*, *C. pyricola*). Mery pocházely z čerstvých odchyťů (2021, 2022) nebo byly využity vzorky mer z předchozích let, které byly uchovávány v etanolu (2006–2012). Jedinci byli odchyceni v produkčních výsadbách meruněk, jabloní a hrušní na jižní Moravě a v okolí Holovous (determinace P. Lauterer a autoři metodiky). Druhy byly jednoznačně charakterizovány sekvenčně s využitím primerů LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') a HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.* 1994). Vybrané ověřené sondy a primery byly použity v dalších krocích.

3.1.2 Seznam primerů a sond použitých pro detekci *Cacopsylla* spp.

Univerzální detekční systém

Forward primer 1: TCAGAACTAATCACAARACTATTGG
Forward primer 2: TAAGAACTAACCAYAAAAYTATTGG
Reverse primer 1: TAAATTTGRTCRTTYATTAARACAGG
Reverse primer 2: TAAATTTGGTCATTTATTAAGACGGG
Sonda 1: TTAAGACARTCYTCCCCYGT
Sonda 2: TTAAGACAATCCTCTCCTGT

Sondy označeny fluoroforem 6-FAM.

Specifický detekční systém

C. mali: Forward primer: CTAGTTCCATCTCTTTATCTTCTCTT
Reverse primer: ACTGTGAAATATAGAATTAGATAGGG
Sonda: AAGGAGTTGGTACAGGATGAACA

Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.

C. melanoneura: Forward primer: GATTCCCTCTCTAYCTTCTC
Reverse primer: CTGTGAAATATCGAGTTGGATAGAG
Sonda: AAGGTGTTGGAAGTGGTTGAACT

Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.

C. picta: Forward primer: GATYCCGTCTCTTTATCTTCTT
Reverse primer: CTATGGAACATAGAATTAGACAGTG
Sonda: AAGGTGTCGGAACAGGATGAACA

Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.

<i>C. pruni:</i>	Forward primer:	AATCCCATCTCTTTACCTCCTTTT
	Reverse primer:	ACTGTGGAATATAGAATTAGATAGGG
	Sonda:	AAGGAGTAGGGACAGGTTGAACT
		Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.
<i>C. pyri:</i>	Forward primer:	AATCCCCTCTTTGTATCTACTTTT
	Reverse primer:	ACTGTGAAATATTGAATTAGAAAGGG
	Sonda:	AAGGAGTAGGAACTGGTTGAACT
		Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.
<i>C. pyrisuga:</i>	Forward primer:	ATYCCATCTCTTTACCTTCTTTT
	Reverse primer:	ACTATGGAATATAGAGTTAGACAACG
	Sonda:	AAGGTGTTGGGACAGGTTGAACC
		Sonda označena fluoroforem HEX/VIC.

Systémy pro identifikaci jednotlivých druhů mer byly navrženy tak, aby je bylo možné v případě potřeby zkombinovat do multiplexní real-time PCR reakce, čehož lze dosáhnout vhodnou kombinací fluoroforů pro jednotlivé sondy. Lze tak kombinovat systém pro vybranou skupinu mer (např. mery hrušňových sadů) nebo univerzální detekci mer se specifickou detekcí konkrétního druhu.

3.2 Postup determinace mer rodu *Cacopsylla* metodou real-time PCR

Vlastní postup identifikace vybraných druhů rodu *Cacopsylla* pomocí real-time PCR lze rozdělit do třech fází:

- Pre-analytická fáze (odchyt hmyzu a jeho příjem do laboratoře, uchování do doby analýzy)
- Analytická fáze (zpracování vzorků hmyzu v laboratoři, homogenizace, izolace DNA, sestavení PCR reakce)
- Post-analytická fáze (vyhodnocení a interpretace výsledků)

3.2.1 Pre-analytická fáze

Pro molekulární determinaci mer se doporučuje provést jejich odchyt pomocí sklepvádky nebo sítky. Po odchytu se mery vloží do vzorkovnice, která obsahuje 96% čistý etanol. Takto zakonzervované vzorky je možné okamžitě zpracovat v laboratoři nebo uchovat při teplotě -20 °C do doby zpracování.

3.2.2 Analytická fáze

Vlastní analytická fáze se provádí ve dvou krocích:

- Izolace DNA
- Real-time PCR detekce

3.2.2.1 Izolace DNA

Metodika využívá následujícího postupu a reagensů pro izolaci DNA:

- Homogenizace hmyzích tkání se provádí mechanickou homogenizací vysokorychlostním třepáním za použití skleněných perliček BashingBeads™ pomocí přístroje TissueLyser (výrobce Qiagen).
- Vlastní izolace DNA se provádí pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu Quick-DNA™ Tissue/Insect Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH; k.č. D6016; dodává Forezní DNA servis, s.r.o.) na bázi kolon. Postupuje se podle návodu výrobce.
- Specifikace kitu a typické výtěžky dle výrobce (Tabulka 1.):

Tabulka 1. Specifikace Quick DNA Tissue/Insect Miniprep Kitu dle výrobce Zymo Research

Specifikace	Quick-DNA™ Tissue/Insect
Typ izolace	Kolonová
Maximální množství výchozího vzorku	~ 50 mg hmyzu (čerstvý, zmražený nebo konzervovaný)
Maximální objem kolony	~ 800 µl
Minimální eluční objem	35 µl
Maximální vazebná kapacita	~ 25 µg

- Typický výtěžek DNA z 1 mery (*Cacopsylla* sp.) je **0,31 µg** (vlastní laboratorní výsledky, průměr z více jak 200 izolací).
- Izolace byla úspěšně vyzkoušena i na nymfách *C. melanoneura* stádia 2 (2 vzorky) a stádia 4–5 (2 vzorky).
- Izolovaná DNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbancí A260/A280) cca 1,8. Pokud je poměr nižší nebo výrazně vyšší, nelze vyloučit negativní dopad na citlivost analýz.
- Purifikovanou DNA je možné pro další analýzy dlouhodobě skladovat při ≤ -20 °C.
- Izolace DNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Všechny centrifugační kroky se provádějí ve stolní centrifuze s rotorem pro 2ml mikrozkušavky při pokojové teplotě, při otáčkách 10 000 g nebo 8 000 g dle postupu.
- Před prací je nutné se seznámit s bezpečnostním listem beta-mercaptoethanolu. Při práci s beta-mercaptoethanolem (98%) použijte digestoř a určené ochranné pracovní pomůcky a oděvy.
- Před prvním použitím izolačního kitu je nutné přidat beta-mercaptoethanol (98%; není součástí kitu) k pufru „**Genomic Lysis Buffer**“ podle údajů uvedených v návodu nebo na lahvičce. Po přidání se na lahvičce čitelně vyznačí, že beta-mercaptoethanol byl přidán. Pracovník, který s kitem pracuje jako první, označí všechny lahvičky svým jménem a datem otevření.
- Před začátkem vlastní izolace protřepejte pufr „**BashingBead™ Buffer**“.
- Před začátkem vlastní izolace zkontrolujte, zda v pufru „**DNA Pre-Wash Buffer**“ nejsou sraženiny. Pokud ano, umístěte lahvičku s pufrům na vyhřívaný blok a rozpouštějte je při 30–37 °C po dobu 30 minut, poté pufr protřepejte.

Pracovní postup

1. Jedinec hmyzu (případně více jedinců o maximální hmotnosti 50 mg) se vloží do zkumavky s perličkami o velikosti 2 mm „**ZR BashingBead™ Lysis Tube (2.0 mm)**“ a přidá se 750 µl pufru „**BashingBead™ Buffer**“.
2. Zkumavka se ponechá třepat v homogenizátoru po dobu 5 minut při maximální frekvenci 30 Hz a poté se centrifuguje 1 minutu při 10 000 g.
3. 400 µl lyzátu se přenesse na kolonu „**Zymo-Spin™ III-F Filter**“ se sběrnou zkumavkou a centrifuguje se 1 minutu při 8 000 × g.
4. K získanému filtrátu ve sběrné zkumavce z kroku 3 se přidá 1 200 µl „**Genomic Lysis Buffer**“ pufru a směs se promíchá opakovaným protažením špičkou pipety.
5. 800 µl směsi z kroku 4 se přenesse na kolonu „**Zymo-Spin™ IICR Column**“ se sběrnou zkumavkou a centrifuguje se 1 minutu při 10 000 × g. Proteklá tekutina se vyleje, hrany sběrné zkumavky se otřou buničitou vatou. IICR kolona se opět vrátí do sběrné zkumavky.
6. Na IICR kolonu se nanese zbytek směsi. Centrifuguje se 1 minutu při 10 000 × g. Sběrná zkumavka s proteklou tekutinou se zlikviduje a IICR kolona se nasadí do nové sběrné zkumavky.
7. Na kolonu IICR s novou sběrnou zkumavkou se přidá 200 µl „**DNA Pre-Wash Buffer**“ pufru a centrifuguje se 1 minutu při 10 000 × g.
8. Na kolonu IICR se sběrnou zkumavkou se přidá 500 µl „**g-DNA Wash Buffer**“ pufru a centrifuguje se 1 minutu při 10 000 × g. Sběrná zkumavka s promývacími pufrů se zlikviduje. Kolona IICR se vloží do 1,5 ml zkumavky.
9. Na matici IICR kolony se přidá 100 µl (minimálně 35 µl) „**DNA Elution Buffer**“ pufru a centrifuguje se 30 sekund při 10 000 × g.
10. Orientační čistota a koncentrace izolované DNA se stanoví pomocí spektrofotometru.
11. Eluovanou DNA je možné použít pro další aplikace nebo zamrazit v ≤ -20 °C.

Existují i další způsoby homogenizace (např. v tekutém dusíku) a izolace DNA z hmyzu, případně nedestruktivní metody izolace DNA zachovávající exoskelet hmyzu pro pozdější determinaci dle morfologie (např. s využitím proteinázy K; Cho *et al.* 2019), ty však nebyly v rámci metodiky testovány, a potenciální uživatel si bude muset tyto postupy verifikovat v podmínkách své laboratoře.

3.2.2.2 Real-time PCR detekce

Úvod

Metodika je určena pro detekci druhů mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* pomocí real-time PCR. Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond. Detekční systém byl optimalizován pro real-time PCR cykler Rotor-Gene Q (Qiagen). Níže uvedený postup byl také ověřen s použitím real-time PCR cyklieru Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Vzhledem k rozmanitosti v laboratořích používaných real-time PCR cyklierů, PCR reagensií, analyzačních software a dalších faktorů je níže uvedený postup pouze ukázkový a odborník v oboru si tento postup přizpůsobí ke konkrétním podmínkám technického a materiálního vybavení laboratoře.

Sestavení vlastní real-time PCR reakce

- Příprava PCR reakce probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Přidávání syntetických pozitivních kontrol probíhá výhradně v místnosti post-PCR area.
- Pro pipetování se používají špičky s filtrem.
- Pro vlastní PCR byl použit qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio).
- Všechny PCR komponenty se před zahájením práce vyjmou z mrazničky a nechají se roztát při pokojové teplotě.
- Před použitím je vhodné PCR komponenty promíchat krátkým vortexováním a poté krátce stočit na minicentrifuze.
- Pro zajištění validity výsledků se používá systém minimálně následujících kontrol:
 - Kontrola bez přidané DNA (No-Template Control; NTC)
Jedná se o kontrolu bez přidání vzorku. Tato kontrola se používá vždy u každého testování.
 - Pozitivní kontrola
Zpravidla se jedná o syntetickou pozitivní kontrolu o známé koncentraci.
 - Interní kontrola kvality izolované DNA, interní pozitivní kontrola (IPC)
Jako IPC může sloužit systém pro univerzální detekci mer, který by měl poskytovat pozitivní signál pro druhy rodu *Cacopsylla*. Tento test je vhodné provádět ke každému analyzovanému vzorku.

1. V PCR boxu se do vychlazeného stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkuvek pro NTC (kontrola bez přidané DNA) a syntetickou pozitivní kontrolu.
2. Podle počtu vzorků a míchaných typů PCR se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkuvek, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle rozpisu (Tabulka 2. a 3.).

Tabulka 2. Rozpis pro univerzální detekci mer rodu *Cacopsylla*.

Rod <i>Cacopsylla</i>, univerzální detekce	Na 1 vzorek	Finální koncentrace
PCR voda	6,78 μ l	
Forward primer 1 (50 μ M)	0,2 μ l	0,5 μM
Forward primer 2 (50 μ M)	0,2 μ l	0,5 μM
Reverse primer 1 (50 μ M)	0,4 μ l	1 μM
Reverse primer 2 (50 μ M)	0,2 μ l	0,5 μM
Sonda 1 (50 μ M)	0,13 μ l	0,325 μM
Sonda 2 (50 μ M)	0,09 μ l	0,225 μM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 μ l	1 \times
Celkem	18 μl	

Tabulka 3. Rozpis pro specifickou identifikaci druhů mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*.

Specifická identifikace vybraných druhů	Na 1 vzorek	Finální konc.
PCR voda	7,52 μ l	
Druhově-specifický forward primer (50 μ M)	0,2 μ l	0,5 uM
Druhově-specifický reverse primer (50 μ M)	0,2 μ l	0,5 uM
Druhově-specifická sonda (50 μ M)	0,08 μ l	0,2 uM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 μ l	1x
Celkem	18 μl	

3. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 μ l.
5. K mastermixu se postupně pipetují 2 μ l DNA testovaného vzorku.
6. Po uzavření všech zkumavek se vzorky DNA s NTC kontrolou v post-PCR místnosti přidají 2 μ l syntetické pozitivní kontroly.
7. Po zapnutí cyklieru Rotor-Gene Q se připraví teplotní profil s následujícími parametry:

Rod *Cacopsylla*, univerzální detekce

- 1 cyklus: 94 °C 5 min
 35 cyklů: 94 °C 20 s
 54 °C 20 s (čtení 6-FAM v zeleném kanálu)
 72 °C 20 s

Specifická detekce *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*

- 1 cyklus: 94 °C 5 min
 35 cyklů: 94 °C 20 s
 58 °C 20 s (čtení HEX/VIC ve žlutém kanálu)
 72 °C 20 s

- Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty.
Green: 6,00; Yellow: 6,33
Jedná se pouze o orientační hodnoty, přesné nastavení si musí uživatel provést sám během prvních tří cyklů nebo po prvním běhu dle návodu výrobce.
- Celý proces amplifikace trvá přibližně 1 hod 30 min.
- Pro specifickou detekci je možné použít i teplotní profil pro univerzální detekci se čtením ve žlutém kanálu, nelze však vyloučit pozorování velmi slabé nespecifické reakce.
- Délka PCR amplikonu pro univerzální detekci *Cacopsylla* spp.: 139 bp
Délka PCR amplikonu pro specifickou detekci *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*: 105 bp
- V případě potřeby je možné výsledné PCR produkty uchovávat při teplotě ≤ -18 °C po dobu minimálně jednoho roku.

Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklieru

Uživatelé jiných real-time PCR cyklierů než Rotor-Gene Q se musí před objednáním sond (detekčního kitu) seznámit s možnostmi detekce různých fluoroforů na svém PCR cyklieru a s možnostmi příslušného analyzačního softwaru. Dále je nutné posoudit možnosti přístroje pro případné multiplexování a naprogramovat příslušný teplotní PCR protokol.

3.2.3 Post-analytická fáze

V této fázi se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace.

Kritické body post-analytické fáze, na které je třeba zvláště dbát:

- Správné vyhodnocení systému kontrol zajišťujících validitu výsledků.

3.2.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

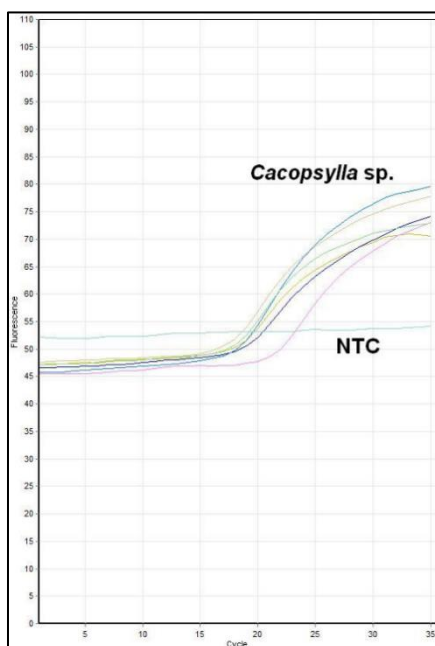
Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q

Pro vyhodnocení PCR běhu se používá identický software jako pro ovládání cyklieru. Přesný postup vyhodnocování různých typů experimentů je uveden v příručce výrobce cyklieru nebo přímo v nápovědě tohoto softwaru.

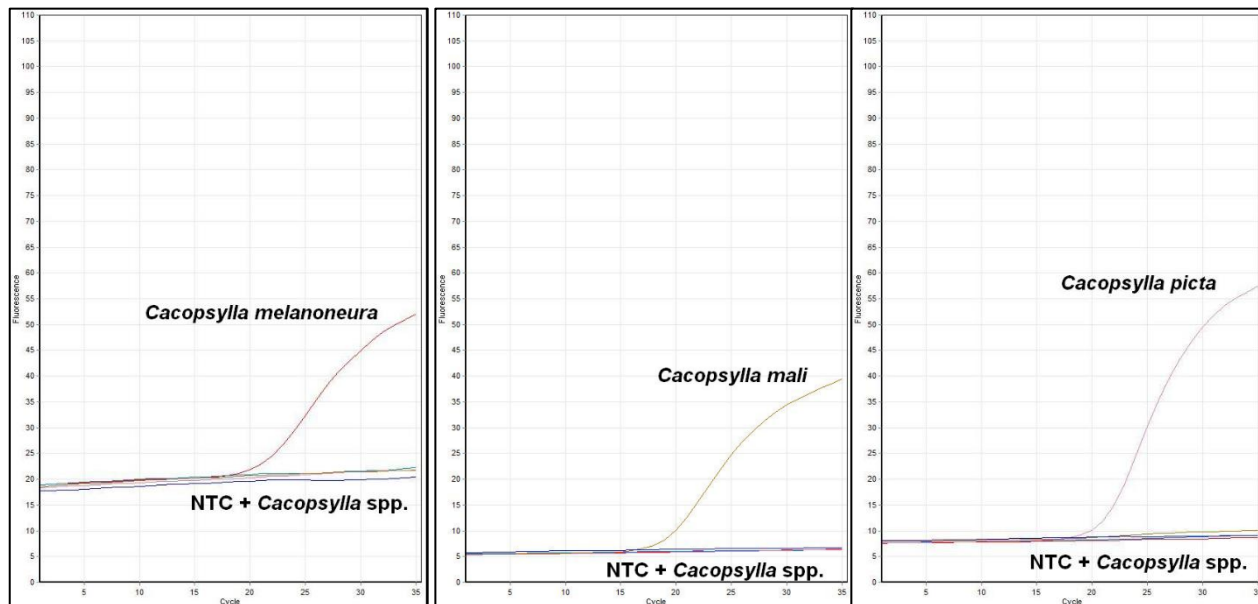
Po ukončení běhu se provede vyhodnocení s odečtením hodnoty Ct. Použité parametry:

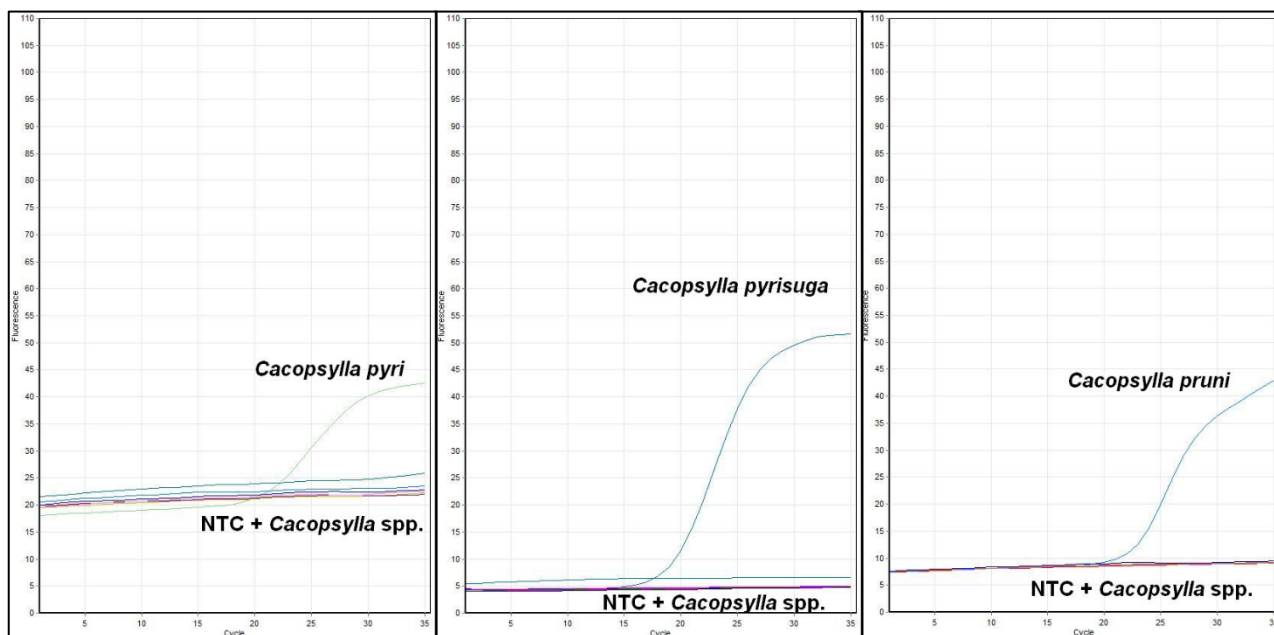
Dynamic tube:	ANO
Slope correct:	ANO
Ignore first:	Fakultativně. Doporučuje se použít v případech, kdy fluorescence během první cca 10 cyklů vykazuje průběh ve tvaru písmena „U“. Zpravidla se stává v oranžovém kanálu pro sondy značné ROX.
Threshold:	0,01
Eliminate cycles before:	Dle potřeby

Obrázek 1. Ukázka výstupu univerzální detekce mer rodu *Cacopsylla* z přístroje Rotor-Gene Q (neanalyzovaná data)



Obrázek 2. Ukázka výstupu specifické detekce jednotlivých druhů mer z přístroje Rotor-Gene Q (neanalyzovaná data)





Vyhodnocení systému kontrol kvality

Negativní kontrola

Negativní kontrola představuje PCR reakci bez přidaného templátu (DNA), tzv. netemplátovaná kontrola (NTC). NTC by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

Pozitivní kontrola

Pro kontrolu kvality PCR reakce se používají dva typy kontrol. Pozitivní kontrolu může představovat již dříve charakterizovaný vzorek nebo zpravidla syntetický standard, který má stejnou sekvenci jako cílové místo pro PCR amplifikaci. Pozitivní kontrola představuje referenční materiál s definovaným rozpětím hodnot Ct, ve kterém se při zohlednění reprodukovatelnosti metody musí nálezy pohybovat u každého PCR běhu bez ohledu na osobu provádějící analýzu.

Interní kontrola kvality (IPC)

Interní kontrola kvality (IPC) slouží ke dvěma účelům: kontrola kvality izolace DNA a zároveň jako kontrola případné inhibice. Technicky se jedná o detekci specifického úseku mitochondriálního genu COI pro rod *Cacopsylla* a musí pro každý vzorek mery vyjít pozitivní s Ct hodnotou v určitém rozmezí. Doporučuje se proto hodnoty Ct dlouhodobě sledovat, protože pro obdobné vzorky bývají hodnoty při standardních podmínkách velmi podobné.

Další kontroly

Pro kontrolu případné kontaminace reagentů používaných pro izolace DNA lze doporučit zařazení tzv. extrakční kontroly, kdy se provede izolace bez vzorku hmyzu. S touto kontrolou se poté pracuje jako se vzorkem. Extrakční kontrola by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

3.2.4 Příklady využití systému pro determinaci mer ovocných stromů, interpretace výsledků

Všechny systémy pro determinaci mer byly testovány na rozsáhlém souboru mer, jejichž druhová identita byla určena na základě typických morfologických znaků a následně také ověřena na základě sekvenční identity parciální sekvence COI genu se známými sekvencemi jednotlivých druhů v databázi GenBank. Celkem bylo v rámci vývoje systémů otestováno 176 jedinců mer, z toho 26 mer (15 %) nebylo předmětem cílené identifikace. U všech vzorků byl zaznamenán pozitivní výsledek s využitím univerzálního detekčního systému (Tabulka 4.). Průměrné Ct hodnoty se pohybovaly od cca 17 do 24.

Tabulka 4. Výsledky použití univerzálního detekčního systému pro detekci mer rodu *Cacopsylla*. Morfologicky a sekvenčně nezařazené druhy mer jsou označeny jako *Cacopsylla* sp. (A-C). Druhy mer, pro které byly vyvíjeny cílené detekční systémy, jsou zeleně podbarveny.

Druh	Testováno (n)	Pozitivních (n) <i>Cacopsylla</i> univerzální detekce qPCR	Ø Ct
<i>Cacopsylla mali</i>	25	25	18,00
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	25	25	19,74
<i>Cacopsylla picta</i>	25	25	19,74
<i>Cacopsylla pruni</i>	25	25	17,13
<i>Cacopsylla pyri</i>	25	25	19,47
<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	25	25	18,98
<i>Cacopsylla brunneipennis</i>	5	5	19,97
<i>Cacopsylla crataegi</i>	2	2	23,95
<i>Cacopsylla pyricola</i>	9	9	22,72
<i>Cacopsylla</i> sp. A	3	3	21,12
<i>Cacopsylla</i> sp. B	4	4	19,63
<i>Cacopsylla</i> sp. C	3	3	17,91
Celkem	176	176 (100 %)	
Z toho necílové druhy mer	26	26 (100 %)	

Soubor mer byl testován pomocí specifických identifikačních systémů pro mery napadající primárně jabloně (*Cacopsylla melanoneura*, *Cacopsylla mali*, *Cacopsylla picta*) (Tabulka 5.), hrušně (*Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyrisuga*) (Tabulka 6.) a meruňky (*Cacopsylla pruni*) (Tabulka 7.). Ve všech případech byly identifikovány pouze všechny cílové mery, takže dané real-time PCR systémy jsou za použitých testovacích podmínek 100% specifické a lze je využít pro molekulární determinaci mer ovocných stromů.

Tabulka 5. Výsledky použití specifického identifikačního systému pro mery napadající primárně jabloně (*Cacopsylla melanoneura*, *Cacopsylla mali*, *Cacopsylla picta*). Morfologicky a sekvenčně nezařazené druhy mer jsou označeny jako *Cacopsylla* sp. (A-C). Cílový druh mer je zeleně podbarven.

Druh	Testováno (n)	Specifická real-time PCR (pozitivních; n)					
		<i>Cacopsylla melanoneura</i>		<i>Cacopsylla mali</i>		<i>Cacopsylla picta</i>	
			Ø Ct		Ø Ct		Ø Ct
<i>Cacopsylla mali</i>	25	negativní		25 (100 %)	14,54	negativní	
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	25	25 (100 %)		17,91	negativní		negativní
<i>Cacopsylla picta</i>	25	negativní		negativní		25 (100 %)	
<i>Cacopsylla pruni</i>	25	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	25	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	25	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla brunneipennis</i>	5	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla crataegi</i>	2	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyricola</i>	9	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. A	3	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. B	4	negativní		negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. C	3	negativní		negativní		negativní	
Celkem	176	25		25		25	
Necílové druhy mer	151	0		0		0	

Tabulka 6. Výsledky použití specifického identifikačního systému pro mery napadající primárně hrušně (*Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyrisuga*). Morfologicky a sekvenčně nezařazené druhy mer jsou označeny jako *Cacopsylla* sp. (A-C). Cílový druh mer je zeleně podbarven.

Druh	Testováno (n)	Specifická real-time PCR (pozitivních; n)			
		<i>Cacopsylla pyri</i>		<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	
			Ø Ct		Ø Ct
<i>Cacopsylla mali</i>	25	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	25	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla picta</i>	25	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pruni</i>	25	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	25	25 (100 %)		18,69	negativní
<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	25	negativní		25 (100 %)	
<i>Cacopsylla brunneipennis</i>	5	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla crataegi</i>	2	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyricola</i>	9	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. A	3	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. B	4	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. C	3	negativní		negativní	
Celkem	176	25		25	
Necílové druhy mer	151	0		0	

Tabulka 7. Výsledky použití specifického identifikačního systému pro meru napadající primárně meruňky (*Cacopsylla pruni*). Morfologicky a sekvenčně nezařazené druhy mer jsou označeny jako *Cacopsylla* sp. (A-C). Cílový druh mer je zeleně podbarven.

Druh	Testováno (n)	Specifická real-time PCR (pozitivních; n)	
		<i>Cacopsylla pruni</i>	Ø Ct
<i>Cacopsylla mali</i>	25	negativní	
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	25	negativní	
<i>Cacopsylla picta</i>	25	negativní	
<i>Cacopsylla pruni</i>	25	25 (100 %)	14,30
<i>Cacopsylla pyri</i>	25	negativní	
<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	25	negativní	
<i>Cacopsylla brunneipennis</i>	5	negativní	
<i>Cacopsylla crataegi</i>	2	negativní	
<i>Cacopsylla pyricola</i>	9	negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. A	3	negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. B	4	negativní	
<i>Cacopsylla</i> sp. C	3	negativní	
Celkem	176	25	
Necílové druhy mer	151	0	

Metodika byla úspěšně vyzkoušena i pro druhovou determinaci larválních stádií *C. melanoneura* (nymfy stádia N2 a N4-N5) s obdobnými výsledky (Tabulka 8.). Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že metodika může být úspěšně použita i pro druhovou identifikaci larválních stádií ostatních cílových mer.

Tabulka 8. Výsledky použití univerzálního a specifického systému pro identifikaci larválního stádia mery *Cacopsylla melanoneura*.

Larvální stádium	Testováno (n)	Pozitivních (n) <i>Cacopsylla</i> <u>univerzální</u> detekce qPCR	Ø Ct	Pozitivních (n) <i>Cacopsylla melanoneura</i> <u>specifická</u> identifikace qPCR	Ø Ct
Nymfa stádium N2	2	2 (100 %)	21,04	2 (100 %)	19,87
Nymfa stádium N4-N5	2	2 (100 %)	17,9	2 (100 %)	16,5

Doporučení pro interpretaci nálezů.

- Ct hodnoty univerzálního detekčního systému (IPC) při analýze jedné mery by se měly pohybovat do 25. Obdobné hodnoty lze očekávat i při analýze nymf.

- Za daných podmínek testování vykazovaly specifické systémy determinace mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* 100% specificitu – byly detekovány všechny vzorky daného druhu a žádný necílový druh.
- Hodnoty Ct u specifické determinace jsou vždy nižší než příslušné hodnoty Ct univerzální determinace. Toto kritérium lze využít např. v případě, kdy je u specifické identifikace nalezena výrazně vyšší Ct hodnota než u univerzální detekce, která vykazuje běžné hodnoty Ct – může se jednat o druh mery, který je příbuzný detekované měře, ale v době testování systému nebyl znám. V případě zájmu doporučujeme provést sekvenační determinaci s využitím primerů dle Folmer *et al.* (1994) nebo morfologickou determinaci s využitím klíčů Ossiannilsson (1992) a Burckhardt (2010), pokud je k dispozici exoskelet mery.
- Pokud jsou výsledky u specifické identifikace negativní a hodnoty Ct jsou u univerzální detekce pozitivní v očekávaném rozsahu, jedná se o jiný druh mery, než na který je determinační systém zaměřen. V případě požadavku na určení druhu doporučujeme provést sekvenační (morfologickou pokud lze) determinaci.
- Všechny pozitivní kontroly musí být pozitivní ve stanoveném rozsahu definovaném uživatelem metodiky v závislosti na typu používané pozitivní kontroly.
- Všechny NTC kontroly musí být negativní.
- Extrakční kontrola musí být negativní.

Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklieru

Uživatelé jiných typů real-time cyklierů provádějí vyhodnocení dle doporučení výrobce daného cyklieru pro jednotlivé typy analýz.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V literatuře nebyla zatím publikována rychlá a přesná metoda molekulární determinace dospělců a larválních stádií zástupců rodu *Cacopsylla* vyskytujících se v ovocných výsadbách (*C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*), která by mohla být využita pro rutinní diagnostiku. Běžnou praxí je identifikace mer rodu *Cacopsylla* na základě typických morfologických znaků s využitím klíčů (např. Ossiannilsson (1992), Burckhardt (2010)), což ovšem naráží na odlišnosti mezi pohlavími a jednotlivými vývojovými stádii, kdy samci jsou relativně dobře odlišitelní, ale samice některých druhů si jsou podobné a larvální stádia jsou jen obtížně, pokud vůbec, odlišitelná. Morfologická determinace tak může být časově náročná a vyžaduje zapojení zkušeného entomologa. Z toho důvodu také někdy dochází i k chybným identifikacím zástupců tohoto rodu, což bylo prokázáno např. ve studii zabývající se molekulární determinací zástupců mer rodu *Cacopsylla* vyskytujících se na hrušních ve východní Asii, Evropě a Íránu (Cho *et al.* 2020). Morfologická podobnost, přítomnost sezónního dimorfismu, který ovlivňuje barvu, velikost a morfologii křídel dospělých jedinců hrušňových mer, dříve vedly k chybám v taxonomii mer, které byly odhaleny mimo jiné pomocí tzv. „DNA barcoding“ analýzy 11 druhů z rodu *Cacopsylla* využívající 4 fragmenty mitochondriálních genů (COI 658 bp, COI 403 bp, COI-tRNA^{Leu}-COII 580 bp a 16S rDNA 452 bp). Zároveň byla prokázána vhodnost daných genů pro vyřešení taxonomických nejasností a chyb a determinaci jedinců mer do druhu (Cho *et al.* 2020).

Výše zmíněné problémy vedly ke snaze nějaký systém molekulární determinace vyvinout. Dosavadní práce se většinou ale zaměřovaly jen na identifikaci úzké skupiny druhů (např. Sumner-Kalkun *et al.* 2020). Pro účely biologické ochrany mery *C. pyricola*, jednoho z nejvýznamnějších škůdců hrušní v Severní Americe a vektora fytoplazmy chřadnutí hrušní, byla v roce 2003 navržena konvenční PCR metoda umožňující detekci této mery ve střevech jejích přirozených predátorů používaných v rámci nových přístupů tzv. integrované ochrany proti škůdcům. Pro detekci *C. pyricola* byly navrženy dva molekulární markery na COI genu, univerzální o velikosti 188 bp, a specifický o velikosti 271 bp, který umožňoval specifickou detekci *C. pyricola* a *C. pyri* (Agustí *et al.* 2003). [Tento postup je možné doporučit jako komplementární k předkládané metodice pro molekulární determinaci *C. pyricola*, autory metodiky však nebyl ověřen.]

Pro identifikaci větší škály zástupců byl navržen systém PCR-RFLP cílicí opět na oblast COI mtDNA, který umožnil na základě velikosti amplikonu o délce 801-804 bp a jeho následné restriční analýze pomocí restričních enzymů TaqI a AluI molekulární identifikaci vektorů fytoplazmy proliferace jabloně (*C. melanoneura* a *C. picta*) a dalších 8 druhů *Cacopsylla* vyskytujících se v ovocných sadech (Oettl a Schlink 2015). Žádná z publikovaných prací však neumožňuje spolehlivou rutinní molekulární determinaci většiny z hlavních druhů mer, které se běžně vyskytují v našich ovocných výsadbách a na něž cílí daný postup real-time PCR.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Real-time PCR determinace vybraných druhů rodu *Cacopsylla*, škůdců a vektorů fytoplazem způsobujících závažná onemocnění ovocných plodin, může být využita v následujících aktivitách, např.:

- Využití pro determinaci druhu v raných vývojových stádiích (nymfy), kdy je spolehlivé určení druhu na základě morfologických znaků komplikované.
- Sledování výskytu mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* na vybraném území/výsadbách.
- Výzkum šíření mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*.
- Základní výzkum biologie mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*.
- Testování hospodářské škodlivosti mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*.

Metodika je určena zejména pro laboratoře molekulární biologie a pracoviště:

- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ)
- Laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

6.1 Fytosanitární hledisko

Na omezení šíření a škodlivosti fytoplazem je závislá ekonomická konkurenceschopnost českého školkařství a následně českého produkčního ovocnářského sektoru. Hlavními vektory

přenášejícími fytoplazmy jsou přitom zástupci mer rodu *Cacopsylla*, na jejichž real-time PCR determinaci je zaměřena i tato metodika.

Hospodářsky nejvýznamnější skupinou ovocných plodin v ČR jsou jádroviny – jabloně a hrušně. V roce 2022 se na území České republiky nacházelo 5 864 hektarů produkčních výsadeb jabloní, což představuje téměř polovinu z celkové plochy komerčních ovocných sadů. U hrušně bylo evidováno 705 ha. Školkařský sektor vyprodukoval v posledním statisticky zpracovaném roce 2021 celkem 1 288 554 stromků jabloně, 221 789 hrušní a v souhrnu za všechny hlavní tržní druhy 1 090 970 peckovin (Němcová a Buchtová 2022). Produkce školkařských výpěstků ovocných plodin je stabilizovaným ekonomicky významným odvětvím rostlinné výroby s mírně rostoucím potenciálem. Objem v rámci jednotlivých druhů ale meziročně kolísá podle poptávky tržního ovocnářského sektoru i menších pěstitelů. Česká republika je v této oblasti stále v nevýhodné pozici, zejména vůči západním zavedeným producentům školkařského materiálu ovocných dřevin jako je například Nizozemsko nebo Itálie. Vzhledem k neexistenci hraničních fytoosanitárních kontrol a celního řízení mezi státy EU je pravděpodobné riziko přenosu fytoplazem infikovaným materiálem, a to zejména u materiálu importovaného mimo oficiální certifikační systém. Těmito rizikovými materiály mohou být např. soukromé dovozy atraktivních nových velkoplodých odrůd asijských slivoní nebo hrušní, po kterých vzrůstá poptávka zejména u neprofesionálních pěstitelů. Mohou tak vznikat nová ohniska choroby, která jsou riziková zejména v blízkosti ovocných školek, kde se vyskytuje na jednom místě velká koncentrace tržně vysoce hodnotného množitelského materiálu včetně výchozích certifikovaných matečnic.

Fytoplazmami infikované dřeviny není možné na trvalém stanovišti ve výsadbě léčit. Infekce je systémová a hospodářská škodlivost přetrvává v různé míře po celou dobu životnosti jedince v produkčním sadu jádrovin nebo peckovin. Zahraniční údaje prokazují, že hospodářská ztráta na výnose u stromů infikovaných fytoplazmami dosahují 40 až 50 %. Hlavními příčinami ekonomických ztrát v případě proliferace jabloně je výrazně snížená velikost a chuťová kvalita plodů. Jablka z napadených stromů se dají obtížně tržně realizovat. Ekonomické ztráty u fytoplazmy chřadnutí hrušně jsou způsobeny zejména rychlou ztrátou vitality napadených rostlin v sadech a sníženou produkcí plodů menší velikosti. U evropské žloutenky peckovin jsou plody na infikovaných stromech menší, obvykle dříve dozrávají a opadávají, rovněž dochází k prosychání kosterních větví. K největším ekonomickým škodám dochází v rámci peckovin u meruněk, kde infekce způsobuje často odumírání celých stromů s následnou nutností likvidace výsadby. Ve školkařském sektoru hrozí největší ekonomická rizika v případě infekce fytoplazmou u výchozích množitelských matečnic. V případě původních českých tržních odrůd (například hrušní, nebo meruněk) se pak tento materiál nedá nahradit dovozem certifikovaného základního rozmnožovacího materiálu ze zahraničí a infekce fytoplazmou pak ohrožuje celé odvětví tuzemské ovocnářské výroby.

Morfologická identifikace vektorových druhů mer je obtížná kvůli podobnosti dospělců některých druhů, zvláště problematická je identifikace vývojových stadií – nymf. Inovativní postupy pro molekulární determinaci vektorů fytoplazem poskytují spolehlivé informace o přítomnosti potenciálních přenašečů v ovocných školkách a produkčních výsadbách. Počet generací a vývoj se totiž zásadně liší dle druhu. Zatímco *Cacopsylla pyri* přezimuje v sadu jako dospělec, od února klade vajíčka a má 3-4 generace, *Cacopsylla mali* přezimuje jako vajíčka a má pouze 1 generaci a např. *Cacopsylla melanoneura* přezimuje na smrcích a od března naletuje

na jabloně. Navíc insekticidní přípravky fungují pouze na určitá vývojová stadia – některé přípravky jsou ovicidní, většina funguje na larvální stadia N1-N2 než se obalí voskem a na dospělce nefungují téměř žádné. Přesná a včasná znalost vyskytujících se druhů mer ve školce/sadu tak umožní cílenou kontrolu výskytu vektorů a následná opatření s použitím prostředků ochrany rostlin pro zamezení dalšího šíření fytoplazem. Využití popsaného detekčního systému pro determinaci vybraných druhů rodu *Cacopsylla* zefektivní u množitelských porostů insekticidní ochranu, a to hlavně v době náletu mer do výsadeb ze zimovišť. Tato informace zpřesní zejména cílový vektorový organismus a následně i optimální termín a četnost ošetření. Včasná detekce a v metodice popsaná molekulární identifikace mer, jako hlavního přenašeče fytoplazem, může rozhodujícím způsobem zamezit šíření onemocnění a snížit ekonomické ztráty v ekonomicky významném školkařském a produkčním ovocnářském sektoru.

6.2 Laboratorní hledisko

V laboratořích, kde se rutinně provádí izolace nukleových kyselin a real-time PCR, souvisejí náklady se zavedením metodiky pouze s nákupem primerů/sond, případně speciální soupravy pro izolaci DNA z hmyzu. Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení, musí navíc počítat minimálně s pořízením real-time PCR cykleru v ceně cca > 800 000 Kč.

Orientační náklady na jednu analýzu s použitím výše uvedených reagensů jsou následující (bez DPH):

Izolace DNA:	300 Kč
Primery+sondy	5 Kč
PCR reagensie	10 Kč
<u>Další spotřební materiál</u>	<u>40 Kč</u>
Celkem cca	355 Kč

Cena za analýzu se však může významně lišit s využitím alternativních reagensů; zejména pro izolaci DNA jsou k dispozici různé metody/soupravy. Výsledná cena se také bude lišit podle zamýšleného použití metodiky – pro potvrzení konkrétního druhu budou náklady výše uvedené, pokud se bude jednat o identifikaci druhu mery, bude nutné provést více PCR, případně druh mery určit sekvenačně.

Pokud je k dispozici izolovaná DNA testovaného hmyzu, lze v jednom běhu určit až 70 vzorků (cykler Rotor-Gene Q) za přibližně 90 minut. Izolace DNA jednoho vzorku trvá přibližně 30 minut, takže v případě potřeby lze vzorky mer determinovat v čase do 2 hodin od obdržení vzorku.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- AGUSTÍ, N., UNRUH, T. R., WELTER, S. C. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bulletin of Entomological Research*, 2003, 93(3), 179–185. DOI: 10.1079/BER2003236.
- BURCKHARDT D. Pictorial key of Central European *Cacopsylla* species associated with Rosaceae, 2010, <https://www.dlr.rlp.de/Psylliden-english>.
- CHO, G., MALENOVSKÝ, I., LEE, S. Higher-level molecular phylogeny of jumping plant lice (Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea). *Systematic Entomology*, 2019, 44(3), 638–651. DOI: 10.1111/syen.12345.
- CHO, G., MALENOVSKÝ, I., BURCKHARDT, D., INOUE, H., LEE, S. DNA barcoding of pear psyllids (Hemiptera: Psylloidea: Psyllidae), a tale of continued misidentifications. *Bulletin of Entomological Research*, 2020, 110(4), 521–534. DOI: 10.1017/S0007485320000012.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5), 294–999.
- NĚMCOVÁ, V., BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Ministerstvo zemědělství, Praha, 2022, 90 s. ISBN 978-80-7434-676-7.
- OETTL, S., SCHLINK, K. 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*, 2015, 108(5), 2174–2183. DOI: 10.1093/jee/tov204.
- OSSIANNILSSON F. The Psylloidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark, Fauna entomologica Scandinavica 26, 2010, Brill, Leiden – New York – Köln, 347 pp.
- RIEDLE-BAUER, M., PALESKIĆ, C., SCHÖNHUBER, C., STAPLES, M., BRADER, G. Vector transmission and epidemiology of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ in Austria and identification of *Cacopsylla pyrisuga* as new pathogen vector. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2022, 129(2), 375–386. DOI: 10.1007/s41348-021-00526-y.
- SUMNER-KALKUN, J. C., SJÖLUND, M. J., ARNSDORF, Y. M., CARNEGIE, M., HIGHET, F., OUVAR, D., GREENSLADE, A. F. C., BELL, J. R., SIGVALD, R., KENYON, D. M. A diagnostic real-time PCR assay for the rapid identification of the tomato-potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Šulc, 1909) and development of a psyllid barcoding database. *PloS One*, 2020, 15(3), e0230741. DOI: 10.1371/journal.pone.0230741.
- TEDESCHI, R., ALMA, A. Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 2004, 97(1), 8–13. DOI: 10.1093/jee/97.1.8.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Metodika vznikla *de novo* na základě výzkumné a vývojové činnosti autorů a výsledky nebyly zatím publikovány.

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 169936/2023

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Certifikovaná metodika molekulární determinace vektorových druhů mer napadajících ovocné stromy**

Autor/autoři: RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.; Ing. Martina Rejlová;
Ing. Jana Ouředníčková, Ph.D.; Ing. Michal Skalský, Ph.D.;
prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.; Mgr. Dana Šafařová, Ph.D.;
Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.;**
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2023**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe ČR NAZV č.QK21020395, „Produkce fytoplazem prostých školkařských výpěstků a jejich ochrana před reinfekcí“.

Brno 5. 10. 2023

Ing. Daniel Jurečka
ředitel ústavu

.....
podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:
V dne

Mgr. Jan Radoš
Digitální podpis:
11.10.2023 08:58

.....
podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

**Certifikovaná metodika molekulární determinace vektorových druhů mer
napadajících ovocné stromy**

Vydal:

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

1. vydání, 2023

ISBN 978-80-87030-91-2 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/zgw3-5154>

