

ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI DETEKCE '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SPP.' SKUPINY 16SrX METODOU REAL-TIME PCR S VYUŽITÍM RNA JAKO ZDROJOVÉHO MATERIÁLU

INCREASE IN THE DETECTION SENSITIVITY OF '*CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SPP.' 16SrX GROUP BY REAL-TIME PCR USING RNA AS A SOURCE MATERIAL

Martina Rejlová, Lucie Valentová, Radek Čmejla

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

e-mail: martina.rejlova@vsuo.cz

ABSTRACT

'*Candidatus* Phytoplasma spp.' of 16SrX group cause serious diseases of fruit trees. Present work describes a novel method for the 16SrX phytoplasma detection that utilizes RNA instead of DNA as a source material in real-time PCR settings. The analysis was carried out in 20 fruit tree samples that had been previously tested positive either for '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' or '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'. Our results showed that the use of RNA as a source material could lead to an average 3.3fold and 4.2fold increase in the detection sensitivity for '*Ca. P. mali*' and '*Ca. P. pyri*', respectively, and to more than 18fold increase in case of '*Ca. P. prunorum*'. A higher detection sensitivity then translates into a higher possibility of a pathogen detection in a plant material even when it is present in a very low concentration, lowering thus the probability of false negative results.

Keywords: fruit trees, phytopathogen detection, 16S rDNA, real-time PCR, 16SrX phytoplasma

'*Candidatus* Phytoplasma spp.' skupiny 16SrX způsobují závažná onemocnění ovocných dřevin. Tato práce popisuje vylepšenou metodu detekce fytoplazmy ze skupiny 16SrX založenou na použití RNA namísto DNA jako zdrojového materiálu v real-time PCR uspořádání. Analýza byla provedena u 20 vzorků ovocných stromů, u kterých byla v předchozích diagnostických testech prokázána pozitivita na fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' a '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'. Ukázalo se, že využití RNA jako vstupního materiálu vede v průměru až k 3,3x a 4,2x vyšší citlivosti detekce u '*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*' a k více jak 18x vyšší citlivosti detekce v případě '*Ca. P. prunorum*'. Vyšší citlivost detekce zvyšuje pravděpodobnost záchytu patogenu v rostlinném materiálu již při velmi nízkých koncentracích a snižuje se tak pravděpodobnost falešně negativních výsledků.

Klíčová slova: ovocné dřeviny, diagnostika fytopatogenů, 16S rDNA, real-time PCR, 16SrX fytoplazma

Fytoplazmy jsou bakterie zařazené do třídy Mollicutes, pro níž je typická nepřítomnost buněčné stěny. Obvykle se jedná o organizmy o průměru menším než 1 μm . '*Candidatus Phytoplasma*' je obligátním parazitem žijícím ve vodivém pletivu řady rostlinných druhů. Přenos fytoplazem se uskutečňuje pomocí bodavě savého hmyzu z řádu Heteroptera, a to mer (*Psyllidae*) a kříšů (*Auchenorrhyncha*). Bodavě savý hmyz je nejen vektorem, ale zároveň i alternativním hostitelem fytoplazem. Fytoplazmy se rozšiřují také vegetativně, a to pomocí roubů a oček (Navrátil *et al.* 2008).

Ovocné stromy čeledi Rosaceae mohou být infikovány fytoplazmami způsobujícími významné ekonomické ztráty v produkci ovoce. Klasifikace fytoplazem je založena na základě analýzy 16S rDNA sekvence. Momentálně zahrnuje více než 30 skupin. Skupina 16SrX zahrnuje '*Ca. Phytoplasma mali*', která způsobuje onemocnění proliferace jabloně (apple proliferation, AP), '*Ca. Phytoplasma prunorum*', která je spojena s evropskou žloutenkou peckovin (European stone fruit yellows, ESFY) a '*Ca. Phytoplasma pyri*', která je asociována s chřadnutím hrušně (pear decline, PD) (Seemüller and Schneider 2004, Marcone *et al.* 2010, OEPP/EPPO 2019).

'*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*' jsou uvedeny v seznamu karanténních škodlivých organismů (EPPO A2 list), které European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) doporučuje svým členským zemím regulovat (OEPP/EPPO, 2019). Protože se fytoplazmy přenáší i při vegetativním množení rostlin, je vyhláškou č. 95/2018 Sb. nařízeno testování rozmnožovacího materiálu ovocných rodů a druhů v České republice. Závažnost onemocnění závisí na řadě faktorů biotických a abiotických, včetně druhu, odrůdy, podnoží a věku stromů. Distribuce buněk fytoplazmy ve floému ovocných dřevin je nerovnoměrná a během roku není konstantní. V zimě klesá obsah patogenu v nadzemní části stromu v důsledku degenerace sítkovice a fytoplazmy se více koncentrují v kořenech (Schaper and Seemüller 1982, Seemüller *et al.* 1984).

V současnosti jsou k dispozici k detekci fytoplazem metody lišící se citlivostí a specificitou,

a samozřejmě i finančními, technickými, kapacitními a personálními požadavky.

Detekce fytoplazem mikrobiologickou metodou s použitím fluorescenčního mikroskopu a barviva 4,6-diamino-2-fenylindolem (DAPI), které se specificky váže na DNA, umožňuje rychlé testování v malém měřítku. V rutinní diagnostice se však nevyužívá, protože vyžaduje mikroskopické vybavení a zkušenost při vyhodnocování. Stejně tak se nevyužívá metoda testování pomocí dřevinných indikátorů pro svou časovou náročnost.

Pro rutinní testování '*Ca. P. mali*' ve velkém měřítku lze využít sérologickou metodu Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), která je relativně jednoduchá a přiměřeně levná. Monoklonální protilátky byly vyvinuty proti italskému kmeni způsobujícímu proliferaci jabloně. Většina izolátů '*Ca. P. mali*' pocházejících z několika míst v Itálii a Německu byla detekována pomocí této metody, nicméně se ukázalo, že některé izoláty těmito protilátkami nebyly rozpoznány (Loi *et al.* 2002, Brzin *et al.* 2003, Bioreba). Navíc v současné době neexistují protilátky použitelné pro detekce ostatních dvou fytoplazem – '*Ca. P. pyri*' a '*Ca. P. prunorum*'.

Diagnostika fytoplazem je nyní rutinně prováděna laboratorními technikami na bázi nukleových kyselin a polymerázové řetězové reakce (PCR), která byla rozvinuta do řady variant, jež specificky reagují na potřeby výzkumu a diagnostiky. Základní variantou je konvenční PCR s univerzální detekcí fytoplazmy s následnou analýzou RFLP (restriction fragment length polymorphism – polymorfismus délky restrikčních fragmentů) pro identifikaci druhu skupiny 16SrX (Lorenz *et al.* 1995, OEPP/EPPO 2017). Tzv. nested PCR s následnou analýzou RFLP je specifická pro 16SrX skupinu fytoplazem a využívá 2 sety primerů. První PCR reakce potvrzuje přítomnost fytoplazmy. Následná PCR reakce je specifická pro skupinu 16SrX, kde je využit jako vstupní templát naředený PCR produkt z první reakce. Nested PCR umožňuje detekovat a identifikovat patogen s vyšší citlivostí a specificitou než klasická jedнокroková PCR (Deng and Hiruki 1991, Lorenz *et al.* 1995, OEPP/EPPO 2017). Revolučním krokem pro detekci fytoplazem bylo zavedení kvantitativní

PCR (qPCR) neboli PCR v reálném čase (real-time PCR). V porovnání s nested PCR se snížilo riziko kontaminace, jelikož odpadá potřeba dvoukolové PCR (Olmos *et al.* 1999), a zvýšila se rychlost i citlivost detekce. Zásadní výhodou real-time PCR je možnost kvantifikace cílového úseku DNA ve vzorku. Vyvinuté real-time PCR metody jsou k dispozici pro univerzální detekci fytoplazem (Christensen *et al.* 2004, Hodgetts *et al.* 2009) i pro specifickou detekci a identifikaci fytoplazem ze skupiny 16SrX (Nikolic *et al.* 2010). V případě real-time PCR je však potřeba počítat s podstatně vyšší pořizovací cenou přístrojového vybavení a vyššími náklady na analýzu vzorku. Pro spolehlivou identifikaci mikroorganismů se velmi často využívá stanovení nukleotidové sekvence jejich genu kódujícího 16S rRNA malé ribosomální podjednotky. Obsahuje oblasti, které jsou mezi všemi mikroorganismy velmi konzervované, stejně tak jako oblasti, které jsou variabilní a charakteristické pro každý bakteriální druh. Tato sekvence je v buňce univerzálně přítomná a je dostatečně konzervovaná. Silná a stabilní exprese 16S rDNA genu a tvorba stabilního transkriptu vybízí využít RNA jako zdrojový materiál k identifikaci patogenu. Výhoda použití rDNA genu spočívá i v tom, že primery běžně používané pro PCR detekci na úrovni DNA jsou použitelné i pro detekci na úrovni RNA (cDNA), takže odpadá nutnost optimalizace a je možné přímo porovnat citlivost detekce při použití obou typů nukleových kyselin.

Cílem studie bylo tedy ověřit, zda lze využít RNA coby zdrojového materiálu k detekci fytoplazem skupiny 16SrX pomocí real-time PCR, což by umožnilo komplexní diagnostiku patogenů ovocných dřevin včetně virů pouze z jednoho vstupního materiálu. Takto vylepšená metoda by zrychlila a zlevnila diagnostiku patogenů ovocných stromů, např. při testování certifikovaného rozmnožovacího materiálu nebo při ověřování rostlinného materiálu dováženého ze zahraničí.

MATERIÁL A METODY

Pro porovnání citlivosti detekce patogenu '*Ca. Phytoplasma spp.*' skupiny 16SrX bylo vybráno na základě pozitivitu u již dříve testovaných

vzorků 10 vzorků jaderovin (4 jabloně pro testování '*Ca. P. mali*', 6 hrušní pro testování '*Ca. P. pyri*') a 10 vzorků peckovin pro testování '*Ca. P. prunorum*' (1 slivoň, 9 merunek). Pro analýzu byly vybrány vzorky, které v předchozích testech byly velmi slabě až silně pozitivní, aby se pokryla celá detekční škála. DNA/RNA byla izolována z identického materiálu z lýka výhonů homogenizovaného v tekutém dusíku. Izolace nukleových kyselin se prováděla pomocí komerčně dostupných izolačních kitů na bázi kolonek dle návodu výrobce (firma GeneAll). Izolace RNA se prováděla pomocí kitu RibospinTM Plant s navázkou lýka 50 mg a elucí do 50 μ l RNase-free vody, izolace DNA se prováděla pomocí kitu Exgene Plant SV mini s navázkou lýka 100 mg a elucí do 100 μ l AE pufuru. Pro orientační ověření kvality izolace nukleových kyselin se použilo spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace RNA a DNA v eluátu (NanoDrop Lite, Thermo Scientific). Z izolované RNA byla připravena cDNA pomocí M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) a náhodných hexamerů dle návodu výrobce a následně se použila jako templát pro PCR analýzu. Připravené cDNA a DNA byly testovány na přítomnost fytoplazmy ze skupiny 16SrX pomocí real-time PCR dle akreditované metody zavedené na pracovišti, kdy se využívá specifických oblastí v genu pro ribozomální RNA. Interní kontrola kvality izolace DNA a RNA byla ověřena detekcí přítomnosti chloroplastové 16S rDNA a příslušného transkriptu též v realtime PCR uspořádání. Pro vlastní real-time PCR detekci se použily následující reagenty: qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) dle návodu výrobce, navržené specifické primery a sondy pro chloroplastovou DNA (resp. specifické pouze pro fytoplazmy skupiny 16SrX), 2 μ l čerstvé cDNA nebo DNA bez úpravy koncentrací. Detekce se prováděla pomocí termocykleru RotorGene Q (Qiagen). Počáteční denaturace probíhala po dobu 5 minut při teplotě 94 °C.

Následovala tříkroková amplifikace s 50 cykly, a to denaturace při 94 °C po dobu 20 sekund, hybridizace primerů při teplotě 58 °C po dobu 20 sekund, syntéza komplementárních vláken DNA při teplotě 72 °C v délce trvání 20 sekund. Pro vyhodnocení PCR běhu bylo upraveno nastavení parametru Threshold na hodnotu 0,03.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo analyzováno 20 ovocných dřevin, u kterých byla primárně detekována fytoplazma skupiny 16SrX v rozmezí velmi slabě pozitivní až silně pozitivní. Tyto již dříve testované vzorky výhonů ovocných stromů zahrnovaly 4 jabloně pozitivní na '*Ca. P. mali*', 6 hrušní pozitivních na '*Ca. P. pyri*' a 10 peckovin (1 slivoň, 9 merunek) pozitivních na '*Ca. P. prunorum*'. Hlavním cílem práce bylo ověření možnosti detekce fytoplazem skupiny 16SrX v real-time uspořádání s využitím RNA jako zdrojového materiálu.

Prvním krokem bylo otestování vhodnosti použití RNA pro zamýšlené testy, neboť při použití RNA coby zdrojového materiálu dochází v průběhu postupu (příprava cDNA, PCR) k ředění původního izolátu RNA. Zatímco při standardním postupu s využitím DNA se v PCR reakci analyzuje ekvivalent 2 mg původní rostlinné navážky, v případě RNA se jedná v průměru pouze o 0,35 mg, tedy 5,7x méně vstupního materiálu, což odpovídá rozdílu hodnot Ct o cca 2,5. První otázka tedy zněla, zda exprese genu, který bude použit pro detekci, je dostatečně vysoká, aby se ještě nesnížila citlivost metody. Pro tyto účely byl využit chloroplastový gen 16S rDNA, který je v rostlinách silně exprimován a je součástí chloroplastových ribozomů. Tento gen se běžně používá jako ukazatel kvality izolované DNA, neboť při standardním postupu a standardní navážce jsou hodnoty Ct v úzkém rozmezí pro všechny vzorky. Výhodou je, že lze tento gen analyzovat i na úrovni RNA (cDNA) se stejnými primery a za stejných PCR podmínek jako v případě DNA, což umožňuje přímé porovnání hodnot Ct. Z Grafu 1 je patrné, že u všech skupin ovocných stromů jsou hodnoty Ct jak pro DNA tak RNA v úzkém rozmezí (variační koeficient pro všechna měření je < 0,067) a u všech skupin došlo v případě použití RNA ke snížení hodnot Ct, což indikuje zlepšení citlivosti. Z tabulky 1 je patrné, že k nejlepšimu zlepšení došlo u hrušní (skupina PD), a to cca 8,6x, nejméně pak u jabloní (skupina AP) cca 2,5x. V průměru za všechny vzorky se jednalo o zlepšení 6,1x. Tyto výsledky tedy naznačovaly, že RNA jako vstupní materiál je použitelná pro PCR detekci a navíc dochází i ke zlepšení citlivosti, minimálně na úrovni referenčního genu.

V druhém kroku bylo tedy přistoupeno k detekci jednotlivých fytoplazem v rostlinném materiálu z DNA nebo RNA coby vstupního materiálu a ke vzájemnému porovnání citlivosti. I v tomto případě byl použit gen pro 16S rDNA. Na grafech 2 až 4 jsou demonstrovány hodnoty Ct jak pro DNA tak RNA coby vstupního materiálu pro jednotlivé vzorky, které byly již v předchozích testech pozitivně testovány na přítomnost '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. pyri*' nebo '*Ca. P. prunorum*'. Do testu byly zařazeny vzorky silně až velmi slabě pozitivní, aby se prokázal vliv použití RNA v celé detekční škále. Z grafů je patrné, že u všech vzorků bez ohledu na druh fytoplazmy nebo míru positivity došlo ke snížení hodnot Ct, a tedy ke zvýšení citlivosti detekce. Navíc u čtyř nejméně pozitivních vzorků nebyla fytoplazma na DNA úrovni zachycena vůbec (falešná negativita), ale v případě použití RNA byla přítomnost fytoplazmy ve všech vzorcích potvrzena (Graf 2, '*Ca. P. mali*'; Graf 4, '*Ca. P. prunorum*'). Z tabulky 2 je potom patrné, že k největšímu zvýšení citlivosti detekce při použití RNA coby zdrojového materiálu došlo u '*Ca. P. prunorum*', a to více jak 18x oproti použití DNA; pro '*Ca. P. mali*' a '*Ca. P. pyri*' to bylo méně – 3,3x, respektive 4,2x. V průměru za všechny vzorky se jednalo o více jak 10tinásobné zlepšení citlivosti detekce (10,1x).

Závěrem lze tedy říci, že použití RNA coby vstupního materiálu je pro detekci fytoplazem skupiny 16SrX výhodnější oproti DNA, protože dochází k významnému zlepšení citlivosti detekce a snížení pravděpodobnosti falešně negativních výsledků. Druhým pozitivem je pak možnost použít jeden typ nukleové kyseliny – RNA – jak pro diagnostiku fytoplazem, tak i celého spektra RNA virů. Navíc lze předpokládat, že transkript genu 16S rDNA by bylo možné využít pro citlivější detekci i dalších organismů, např. hub nebo bakterií. Na druhou stranu je příprava RNA a cDNA pracnější, dražší a trvá déle, takže využití RNA coby zdrojového materiálu pro analýzu bude spíše využíváno v případech požadavků na komplexnější diagnostiku, např. při certifikaci rozmnožovacího materiálu nebo analýzách zdravotního stavu dováženého rostlinného materiálu, nebo všude tam, kde jsou vysoké požadavky na citlivost detekčních metod.

PODĚKOVÁNÍ

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

LITERATURA

- BIOREBA. Product Information: DAS-ELISA. Apple proliferation (ApP) [online]. [cit. 1019-07-21]. Dostupné z: http://www.bioreba.chsaasCustomUpload/3ApP_DAS_ELISA.pdf.
- BRZIN, J., P. ERMACORA, R. OSLER, N. LOI, M. RAVNIKAR and N. PETROVIČ. Detection of apple proliferation phytoplasma by ELISA and PCR in growing and dormant apple trees. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2003, **110**(5): 476–483. DOI: 10.1007/BF03356124.
- DENG, S. and C. HIRUKI. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*. 1991, **14**: 53–61. DOI: 10.1016/0167-7012(91)90007-D.
- EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Version 2018-09. Dostupné z: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list.
- EPPO GLOBAL DATABASE. Phytoplasma classification. [online]. [cit. 1019-07-21]. Dostupné z: gd.eppo.int/reporting/article-4783.
- HODGETTS, J, N. BOONHAM, R. MUMFORD and M. DICKINSON. Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied Environmental Microbiology*. 2009, **75**: 2945–2950. DOI: 10.1128/AEM.02610-08.
- CHRISTENSEN, N.M., H. NYSKJOLD and M. NICOLAISEN. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004, **17**: 1175–1184. DOI: 10.1094/MPMI.2004.17.11.1175.
- LOI, N., P. ERMACORA, L. CARRARO, R. OSLER and T. A. CHEN. Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology*. 2002, **108**: 81–86.
- LORENZ, K.-H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS and E. SEEMÜLLER. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*. 1995, **85**: 771–776. DOI: 10.1094/Phyto-85-771.
- MARCONI, C., B. JARAUSCH and W. JARAUSCH. *Candidatus* Phytoplasma prunorum, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. *Journal of Plant Pathology*. 2010, **92**(1): 19–34.
- NAVRÁTIL, M., P. LAUTERER, R. FIALOVÁ, M. BÁRNET, V. FALTA a M. STARÝ. Metodika ochrany proti fytoplazmám ovocných dřevin: Metodika ochrany výsadb jabloní a meruněk proti fytoplazmám a jejich vektorům [online]. [cit. 2019-07-21]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/16189078-Metodika-ochrany-vysadb-jabloni-a-merunek-protifytoplazmam-a-jejich-vektorum.html>.
- NIKOLIĆ, P., N. MEHLE, K. GRUDEN, M. RAVNIKAR and M. DERMASTIA. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes*. 2010, **24**(5): 303–309. DOI:10.1016/j.mcp.2010.06.005.
- OLMOS, A., M. CAMBRA, O. ESTEBAN, M.T. GORRIS and E. TERRADA. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic acids research*. 1999, **27**: 1564-1565. DOI:10.1093/nar/27.6.1564.
- PM 7/62 (2) '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Ca. P. pyri*' and '*Ca. P.prunorum*'. EPPO Bulletin. 2017, **46**: 501–537. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12380> DOI:10.1111/epp.12380.

SEEMÜLLER, E., U. SCHAPER and F. ZIMBELMANN. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 1984, **91**: 371–382.

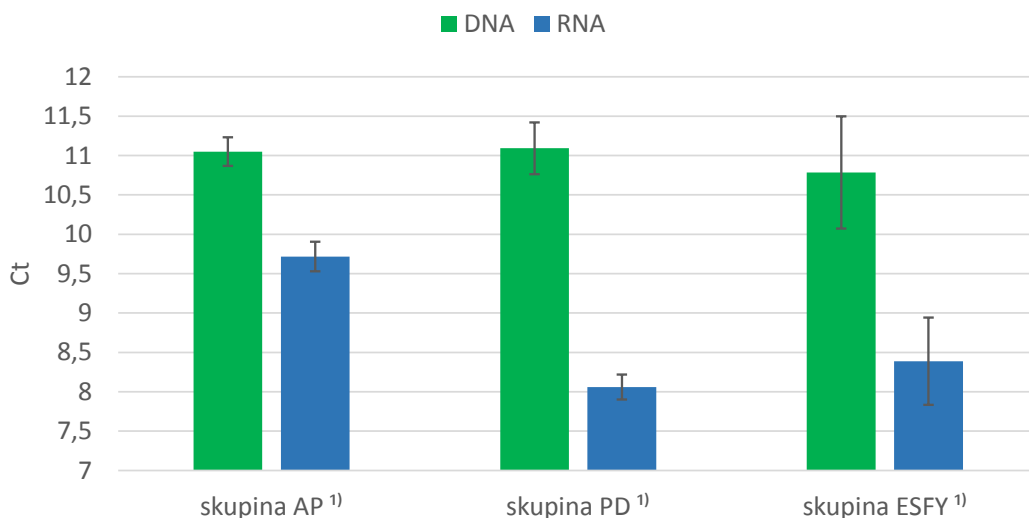
SEEMÜLLER, E. and B. SCHNEIDER. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, **54**(4): 1217–1226.

SCHAPER, U. and E. SEEMÜLLER. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*. 1982, **72**: 736–742.

TABULKY A GRAFY

Graf 1. Hodnoty Ct pro chloroplastovou DNA/RNA u jednotlivých skupin ovocných stromů. Skupina AP představuje jabloně infikované 'Ca. P. mali', skupina PD zahrnuje hrušně infikované 'Ca. P. pyri' a skupina ESFY zahrnuje meruňky a slivoň infikované 'Ca. P. prunorum'

Figure 1. Ct values for chloroplast DNA/RNA in fruit tree samples. Group AP contains apple trees infected with 'Ca. P. mali', group PD contains pear trees infected with 'Ca. P. pyri', and group ESFY contains apricot and plum trees infected with 'Ca. P. prunorum'



1) Group

Tabulka 1. Srovnání citlivosti detekce chloroplastové DNA/RNA u jednotlivých skupin ovocných stromů. Průměrná změna Ct (ΔCt) je dána jako průměr rozdílů Ct hodnot pro RNA a Ct hodnot pro DNA. Průměrné zvýšení citlivosti u použití RNA je spočítáno jako průměr hodnot $2^{-\Delta Ct}$. Pro zjednodušení je kalkulováno se 100% účinností PCR reakce. Skupina AP představuje jabloně infikované 'Ca. P. mali', skupina PD zahrnuje hrušně infikované 'Ca. P. pyri' a skupina ESFY zahrnuje meruňky a slivoň infikované 'Ca. P. prunorum'.

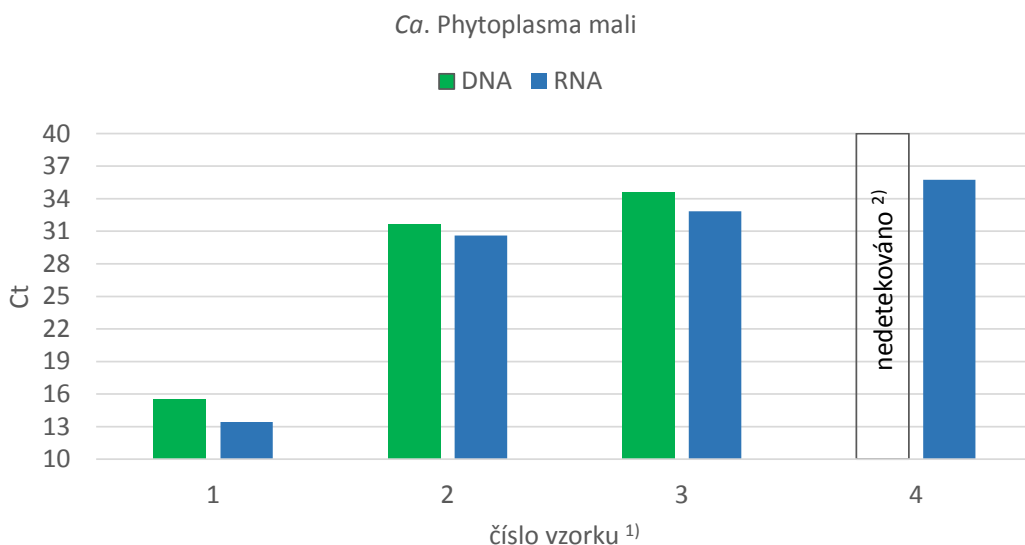
Table 1. Comparison of the detection sensitivity for chloroplast DNA/RNA in fruit tree samples. An average Ct difference (ΔCt) is calculated as a mean of Ct value differences between RNA and DNA. An average increase in sensitivity in RNA assays is calculated as a mean of $2^{-\Delta Ct}$ values. For simplicity, the efficiency of PCR reaction is regarded as 100%. Group AP contains apple trees infected with 'Ca. P. mali', group PD contains pear trees infected with 'Ca. P. pyri', and group ESFY contains apricot and plum trees infected with 'Ca. P. prunorum'.

	Skupina AP ¹⁾	Skupina PD ¹⁾	Skupina ESFY ¹⁾
Průměrná změna Ct (RNA) – Ct (DNA) ²⁾	-1,33	-3,03	-2,40
Směrodatná odchylka ³⁾	0,19	0,42	0,77
Průměrné zvýšení citlivosti RNA vs DNA ⁴⁾	2,5x	8,6x	6x

1) Group, 2) An average Ct difference, 3) Standard deviation, 4) An average increase in sensitivity

Graf 2. Hodnoty Ct pro 'Ca. P. mali' v závislosti na typu použité nukleové kyseliny pro detekci (DNA vs. RNA)

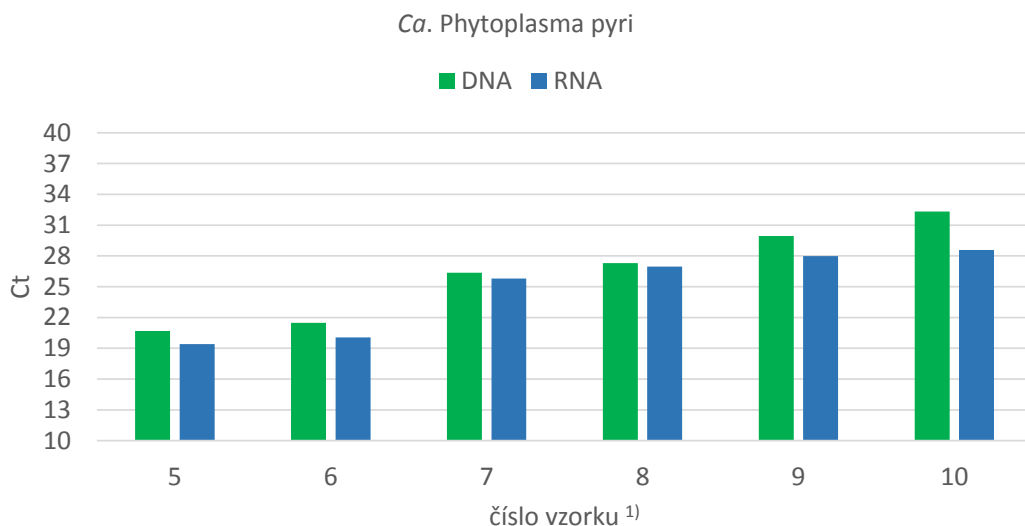
Figure 2. Ct values for 'Ca. P. mali' in relation to the type of nucleic acid used for the detection (DNA vs RNA)



1) Sample ID, 2) Undetected

Graf 3. Hodnoty Ct pro 'Ca. P. pyri' v závislosti na typu použité nukleové kyseliny pro detekci (DNA vs. RNA)

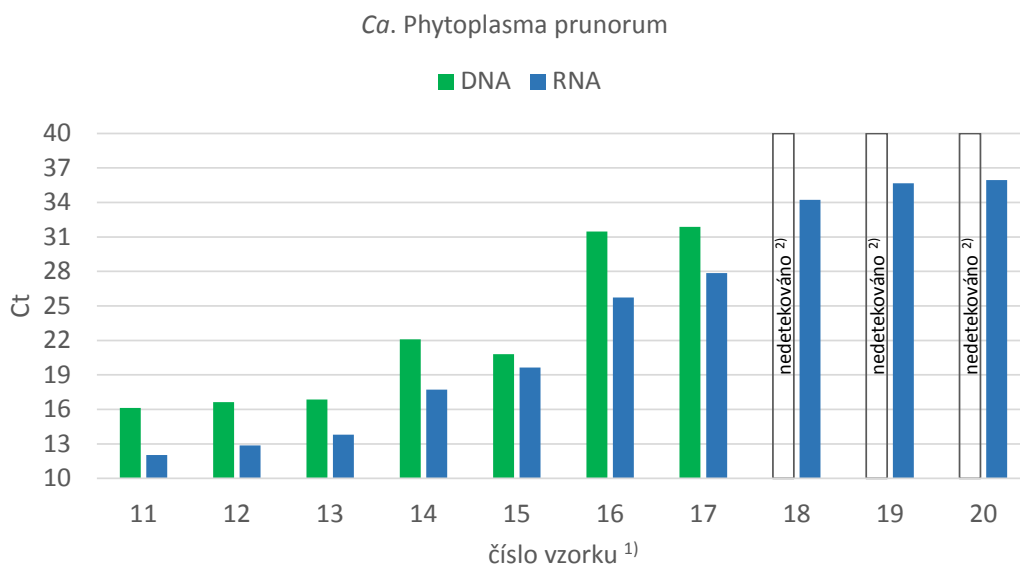
Figure 3. Ct values for 'Ca. P. pyri' in relation to the type of nucleic acid used for the detection (DNA vs RNA)



1) Sample ID

Graf 4. Hodnoty Ct pro 'Ca. P. prunorum' v závislosti na typu použité nukleové kyseliny pro detekci (DNA vs. RNA)

Figure 4. Ct values for 'Ca. P. prunorum' in relation to the type of nucleic acid used for the detection (DNA vs RNA)



1) Sample ID, 2) Undetected

Tabulka 2. Srovnání citlivosti detekce u 'Ca. P. mali', 'Ca. P. pyri' a 'Ca. P. prunorum' v závislosti na typu použité nukleové kyseliny pro detekci (DNA vs. RNA). Průměrná změna Ct (ΔCt) je dána jako průměr rozdílů Ct hodnot pro RNA a Ct hodnot pro DNA. Průměrné zvýšení citlivosti u použití RNA je spočítáno jako průměr hodnot $2^{-\Delta Ct}$. Pro zjednodušení je kalkulováno se 100% účinností PCR reakce.

Table 2. Comparison of the detection sensitivity for 'Ca. P. mali', 'Ca. P. pyri', and 'Ca. P. prunorum' in relation to the type of nucleic acid used for the detection (DNA vs RNA). An average Ct difference (ΔCt) is calculated as a mean of Ct value differences between RNA and DNA. An average increase in sensitivity in RNA assays is calculated as a mean of $2^{-\Delta Ct}$ values. For simplicity, the efficiency of PCR reaction is regarded as 100%.

	Ca. Phytoplasma mali	Ca. Phytoplasma pyri	Ca. Phytoplasma prunorum
Průměrná změna Ct (RNA) – Ct (DNA) ¹⁾	-1,64	-1,55	-3,74
Směrodatná odchylka ²⁾	0,43	1,12	1,29
Průměrné zvýšení citlivosti RNA vs DNA³⁾	3,3x	4,2x	18,8x

1) An average Ct difference, 2) Standard deviation, 3) An average increase in sensitivity