

# MOLEKULÁRNÍ DETERMINACE VAJÍČEK A NYMF VYBRANÝCH MER OVOCNÝCH SADŮ RODU *CACOPSYLLA* METODOU REAL-TIME PCR

## MOLECULAR DETERMINATION OF EGGS AND LARVAL STAGES OF SELECTED FRUIT TREE ORCHARD *CACOPSYLLA* PESTS BY REAL-TIME PCR

Martina Rejlová, Jana Ouředníčková, Lucie Valentová, Radek Čmejla

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

e-mail: Martina.REJLOVA@vsuo.cz, ORCID: 0000-0002-6687-8508

### ABSTRAKT

*Cacopsylla mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga* patří mezi významné škůdce ovocných dřevin. Stromy poškozují sáním a přenosem patogenních bakterií rodu 'Candidatus Phytoplasma', skupiny 16SrX, které způsobují závažné onemocnění vedoucí až k předčasnému odumírání ovocných stromů. Účinná ochrana před těmito škůdci vychází z jejich včasné a spolehlivé determinace a monitoringu v ovocných školkách a výsadbách. Obvykle se determinace dospělých mer provádí dle morfologických kritérií, správně určit druh dle vajíček a larválních stádií je však velmi obtížné až nemožné. V této studii byla pro molekulární determinaci druhů rodu *Cacopsylla* použita metoda na principu real-time PCR, která byla nedávno validována na dospělých jedincích. Na souboru 46 vzorků vajíček a nymf instaru N1 až N5 mer bylo ověřeno, že daný systém je použitelný pro spolehlivou determinaci těchto vývojových stádií. Druhově-specifická PCR umožnila identifikaci 3 druhů mer (*C. melanoneura*, *C. pyri* a *C. pruni*) v analyzovaných vzorcích, výsledky byly potvrzeny sekvenováním genu podjednotky I cytochrom oxidázy (COI). Tuto inovativní molekulární metodu lze tak použít pro rychlou rutinní determinaci všech vývojových stádií vybraných mer napadajících ovocné stromy.

**Klíčová slova:** *Cacopsylla*, vektor, fytoplasma, PCR detekce

### ABSTRACT

*Cacopsylla mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri*, and *C. pyrisuga* belong among important pests of fruit trees. They harm trees by sucking and transmitting pathogenic bacteria of the 'Candidatus Phytoplasma', 16SrX group, which leads to declining and death of fruit trees. Protection against these pests depends on their early reliable identification and monitoring in fruit nurseries and orchards. In general, the determination of adult psyllids is based on morphological criteria, however, it is difficult or even impossible to perform determination using eggs and nymphs. In this study, a recently developed real-time PCR method validated for the

determination of adult psyllids, was applied for the identification of other developmental stages. A total, 46 samples of eggs and nymph instars N1 to N5 were successfully determined, indicating the PCR identification system can be reliably used also for these types of specimens. Specific PCRs detected three species – *C. melanoneura*, *C. pyri* a *C. pruni* which were also confirmed by sequencing of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. Thus, this innovative molecular method can be used for a quick and routine determination of selected *Cacopsylla* species infecting fruit trees in all developmental stages.

**Keywords:** *Cacopsylla*, vector, phytoplasma, PCR detection

## ÚVOD

Mery rodu *Cacopsylla*, zástupci bodavě savého hmyzu, přenáší patogenní bakterie ‘*Candidatus Phytoplasma*’ spp. skupiny 16SrX, které způsobují závažná onemocnění ovocných dřevin. Fytoplazmu proliferace jabloně (‘*Candidatus Phytoplasma mali*’) přenáší mera *C. picta* a mera černožilná *C. melanoneura*. Mera jabloňová *C. mali* saje na jabloních či hrušních, nicméně vektorem fytoplazmy proliferace jabloně není. Mera trnková *C. pruni* je vektorem fytoplazmy evropské žloutenky peckovin (‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’), kterou přenáší mezi hostitelskými ovocnými dřevinami rodu *Prunus*. Mera skvrnitá *C. pyri*, mera hrušňová *C. pyricola* a mera ovocná *C. pyrisuga* jsou vektory fytoplazmy chřadnutí hrušně (‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’) (Tedeschi a Alma 2004, Riedle-Bauer *et al.* 2022). Nymfy mer současně svým působením škodí přímo sáním na pupenech, listech a plodech, nepřímo vylučováním medovice, jež podporuje rozvoj černí.

Mezi dva základní prostředky pro omezení šíření choroby způsobené fytoplazmami se v současné době řadí produkce a používání fytoplazem prostého množitelského materiálu a včasné zachycení přítomnosti přenašečů v ovocných školkách a produkčních výsadbách. Úspěšná ochrana sadů vůči nákaze fytoplazmou spočívá v monitoringu přítomnosti a početnosti vektorů ve všech vývojových stádiích (Kocourek *et al.* 2015, Skalský *et al.* 2018) a následném insekticidním ošetření napadených dřevin. Nicméně k zajištění této činnosti je vyžadována práce zkušeného entomologa, který je schopen na základě morfologických znaků determinovat jednotlivé druhy rodu *Cacopsylla*. Přestože lze nalézt např. na webových stránkách zemědělského výzkumného ústavu RLP AgroScience v Německu determinační klíče pro imaga a nymfy významných druhů rodu *Cacopsylla*, je determinace zejména larválních stádií pouze na základě morfologie problematická, a ne vždy jednoznačná i pro zkušeného entomologa (Burckhardt 2010).

Nedávno byla vyvinuta metoda molekulární determinace druhů rodu *Cacopsylla* na principu real-time PCR, která byla validována na dospělých jedincích mer ovocných sadů s výjimkou *C. pyricola* (Čmejla *et al.* 2023). V předkládané práci byla tato metodika ověřena i pro determinaci mer ve stádiu vajíček a navazujících larválních stádií u 3 druhů rodu *Cacopsylla*.

## MATERIÁL A METODY

Odběry vzorků vajíček a nymf rodu *Cacopsylla* určených k ověření dvou real-time PCR detekčních systémů pro jejich molekulární determinaci probíhal v ovocných výsadbách VŠÚO

Holovousy ve východních Čechách v jarním období od konce března do května 2023 (tabulka 1).

**Tabulka 1.** Přehled vzorků různých vývojových stádií *Cacopsylla* spp. použitých ve studii

**Table 1.** Overview of samples of different developmental stages of *Cacopsylla* spp. used in the study

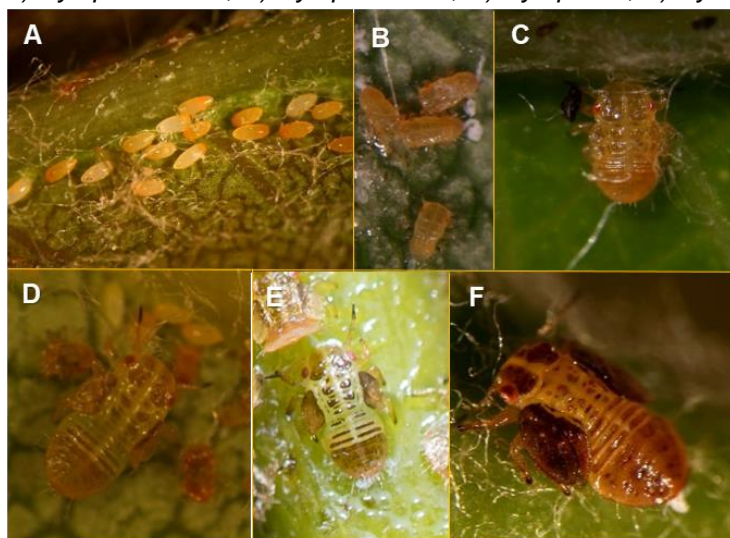
<i>Cacopsylla</i> vývojové stádium <sup>1)</sup>	Testováno vzorků (n) <sup>2)</sup>	Kusů/vzorek (n) <sup>3)</sup>	Odběr: ovocný druh <sup>4)</sup>	Datum odběru <sup>5)</sup>
Vajíčko <sup>6)</sup>	7	8	jabloň <sup>8)</sup>	28. 03. 2023
		3		28. 03. 2023
		6		28. 03. 2023
		10		28. 03. 2023
		11		28. 03. 2023
		20		28. 03. 2023
		9		28. 03. 2023
	2	6	hrušeň <sup>9)</sup>	28. 03. 2023
		6		28. 03. 2023
	3	10	slivoň <sup>10)</sup>	22. 05. 2023
10				22. 05. 2023
10				22. 05. 2023
Nymfa N1–N2 <sup>7)</sup>	8	jabloň <sup>8)</sup>	03. 04. 2023	
	2		15. 05. 2023	
Nymfa N3–N4 <sup>7)</sup>	12	1	hrušeň <sup>9)</sup>	04. 05. 2023
Nymfa N5 <sup>7)</sup>	12	1	hrušeň <sup>9)</sup>	15. 05. 2023

1) *Cacopsylla* developmental stage, 2) Number of tested samples, 3) Pieces per sample, 4) Sampling: fruit species, 5) Date of sampling, 6) Egg, 7) Nymph, 8) Apple, 9) Pear, 10) Plum

Odebrané výhony ovocných dřevin (jabloně, hrušně a slivoně) s různými vývojovými stádii mer byly uchovávány v laboratoři v síťovém izolátoru. U jednotlivých vzorků nymf mer bylo určeno vývojové stádium N1–N5. Na obrázku 1 jsou zachyceny vajíčka a jednotlivé instary nymf.

**Obrázek 1.** Vývojová stádia *Cacopsylla* sp. použitá ve studii. A) Vajíčka nakladená na listu, B) Nymfy N1–N2, C) Nymfa N2–N3, D) Nymfa N3, E) Nymfa N4, F) Nymfa N5

**Picture 1.** Developmental stages of *Cacopsylla* sp. used in the study. A) Eggs laid on a leaf, B) Nymphs N1–N2, C) Nymph N2–N3, D) Nymph N3, E) Nymph N4, F) Nymph N5



(Autoři fotografií: Jana Ouředníčková, Michal Skalský)

Molekulární determinace různých vývojových stádií druhů rodu *Cacopsylla* vyjma dospělců zahrnovala izolaci DNA a následnou real-time PCR. Po odběru byly nymfy a vajíčka konzervovány v 95% ethanolu nebo RNAlater (Sigma-Aldrich). Vajíčka nakladená na listy jabloní byla odebrána a zpracována i s částí listu. Nymfy anebo vajíčka nalepená na kůru hrušní a slivoní byla přenesena do zkumavky bez částí rostliny. V případě okamžitého zpracování byl vzorek rovnou přenesen do speciální zkumavky určené k homogenizaci vzorku, která je součástí komerčního kitu pro izolaci DNA (Quick-DNA™ Tissue/Insect Miniprep Kit; ZYMO RESEARCH). DNA byla izolována podle návodu výrobce. Vajíčka/nymfy byly mechanicky homogenizovány vysokorychlostním třepáním za použití skleněných perliček BashingBeads™ o velikosti 2 mm pomocí přístroje TissueLyser (Qiagen). Pro orientační ověření kvality DNA se využilo spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované nukleové kyseliny (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific).

Pro obecnou detekci druhů rodu *Cacopsylla* byly využity následující primery a sondy (Čmejla *et al.* 2023):

Forward primer 1: TCAGAACTAATCACAARACTATTGG  
 Forward primer 2: TAAGAACTAACCAYAAAAYTATTGG  
 Reverse primer 1: TAAATTTGRTCRTTYATTAARACAGG  
 Reverse primer 2: TAAATTTGGTCATTTATTAAGACGGG  
 Sonda 1: 6-FAM-TTAAGACARTCYTCCCCYGT-BHQ1  
 Sonda 2: 6-FAM-TTAAGACAATCCTCTCCTGT-BHQ1.

Pro specifickou identifikaci šesti druhů rodu *Cacopsylla* vyskytujících se v ovocných sadech byly použity následující primery a sondy (Čmejla *et al.* 2023):

*C. mali*: (forward primer: CTAGTTCCATCTCTTTATCTTCTCTT,  
 reverse primer: ACTGTGAAATATAGAATTAGATAGGG,  
 sonda: AAGGAGTTGGTACAGGATGAACA),  
*C. melanoneura*: (forward primer: GATTCCCTCTCTCTAYCTTCTC,  
 reverse primer: CTGTGAAATATCGAGTTGGATAGAG,  
 sonda: AAGGTGTTGGAAGTGGTTGAACT),  
*C. picta*: (forward primer: GATYCCGTCTCTTTATCTTCTT,  
 reverse primer: CTATGGAACATAGAATTAGACAGTG,  
 sonda: AAGGTGTCGGAACAGGATGAACA),  
*C. pruni*: (forward primer: AATCCCATCTCTTTACCTCCTTTT,  
 reverse primer: ACTGTGGAATATAGAATTAGATAGGG,  
 sonda: AAGGAGTAGGGACAGGTTGAACT),  
*C. pyri*: (forward primer: AATCCCCTCTTTGTATCTACTTTT,  
 reverse primer: ACTGTGAAATATTGAATTAGAAAGGG,  
 sonda: AAGGAGTAGGAACTGGTTGAACT),  
*C. pyrisuga*: (forward primer: ATYCCATCTCTTTACCTTCTTTT,  
 reverse primer: ACTATGGAATATAGAGTTAGACAACG,  
 sonda: AAGGTGTTGGGACAGGTTGAACC).

Všechny sondy byly značeny HEX-BHQ1. Oba detekční systémy byly navrženy do úseku genu podjednotky I cytochrom oxidázy (COI), který se běžně využívá k molekulární identifikaci živočichů. Pro vlastní real-time PCR detekci byly použity následující reagenty: qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio) dle návodu výrobce, navržené specifické primery a sondy pro univerzální detekci nebo specifickou identifikaci druhů rodu *Cacopsylla*, 2 µl DNA bez úpravy koncentrací

a PCR voda do celkového objemu 20  $\mu$ l. Finální koncentrace primerů a sond v PCR reakci jsou uvedeny pro univerzální detekci v tabulce 2 a pro druhově specifickou identifikaci v tabulce 3. Detekce byla provedena pomocí termocykleru Rotor-Gene Q (Qiagen): počáteční denaturace DNA probíhala 5 minut při 94 °C, následovala tříkroková amplifikace DNA s 35 cykly – denaturace 20 sekund při 94 °C, hybridizace primerů 20 sekund při 54 °C, elongace 20 sekund při 72 °C.

**Tabulka 2.** Koncentrace primerů a sond pro univerzální detekci rodu *Cacopsylla*

**Table 2.** Concentrations of primers and probes for universal detection of the genus *Cacopsylla*

Rod <i>Cacopsylla</i> , univerzální detekce <sup>1)</sup>	Finální koncentrace (reakční objem 20 $\mu$ l) <sup>2)</sup>
Forward primer 1	0,5 $\mu$ M
Forward primer 2	0,5 $\mu$ M
Reverse primer 1	0,1 $\mu$ M
Reverse primer 2	0,5 $\mu$ M
Sonda <sup>3)</sup> 1	0,325 $\mu$ M
Sonda <sup>3)</sup> 2	0,225 $\mu$ M

1) *Cacopsylla* genus, universal detection, 2) Final concentration (reaction volume), 3) Probe

**Tabulka 3.** Koncentrace primerů a sond pro specifickou identifikaci mer *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*

**Table 3.** Concentrations of primers and probes for specific identification of psyllids *C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* and *C. pyrisuga*

Specifická identifikace vybraných druhů rodu <i>Cacopsylla</i> <sup>1)</sup>	Finální koncentrace (reakční objem 20 $\mu$ l) <sup>2)</sup>
Druhově-specifický <sup>3)</sup> forward primer	0,5 $\mu$ M
Druhově-specifický <sup>3)</sup> reverse primer	0,5 $\mu$ M
Druhově-specifická sonda <sup>4)</sup>	0,2 $\mu$ M

1) Specific identification of selected species of the genus *Cacopsylla*, 2) Final concentration (reaction volume), 3) Species-specific, 4) Species-specific probe

Jednoznačná druhová identita jednotlivých mer byla určena sekvenováním úseku genu COI vymezeného PCR primery LCO1490 a HC02198 (Folmer *et al.* 1994) a ověřením identifikovaných sekvencí v databázi GenBank. PCR amplikony o velikosti 709 bp byly detekovány pomocí gelové elektroforézy s následnou UV vizualizací. S využitím kitu Expin™ Combo GP (GeneAII) byly amplikony přečištěny a poté sekvenovány pomocí komerčního kitu Gerbera Sequencing Kit v3.1 firmy SEQme s.r.o. Samotné sekvenování proběhlo v 8kapilárním genetickém analyzátoru Applied Biosystems 3500 (Life Technologies) na pracovišti VŠÚO Holovousy. Získané sekvence byly identifikovány pomocí algoritmu BLASTN a databáze GenBank.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Vyvinuté detekční systémy byly testovány na souboru vzorků vývojových stádií mer, která zahrnovala vajíčka a nymfy pěti instarů. Celkem bylo v rámci ověření systémů otestováno 46 vzorků různých vývojových stádií mer. Vzorky byly rozřazeny z pohledu vývojového období stáří do čtyř testovacích skupin zahrnující stádia: vajíčka a nymfy N1–N2, N3–N4 a N5. Dále



byly rozděleny na tři skupiny dle druhu ovocných dřevin, které primárně napadají a využívají jako živné rostliny: mery sající na jabloních, hrušních nebo ovocných stromech rodu *Prunus*. Nicméně druhová identita na základě typických morfologických znaků nebyla určena vzhledem k obtížnému vzájemnému odlišení nymf.

Univerzální detekční systém určující rod *Cacopsylla* potvrdil pozitivní výsledek u všech testovaných vzorků (tabulka 4). Průměrné Ct hodnoty vzorků vajíček a nymf se pohybovaly od cca 13 do 23. Soubor vzorků byl dále testován pomocí specifických identifikačních PCR systémů pro jednotlivé druhy mer. Všechny 46 vzorků vykazovalo pozitivitu pouze v jednom druhově-specifickém testu.

**Tabulka 4.** Výsledné hodnoty Ct (Cycle threshold) získané pomocí univerzálního detekčního systému pro mery rodu *Cacopsylla*

**Table 4.** Ct (Cycle threshold) values obtained using the universal detection system for the genus *Cacopsylla*

Druh <sup>1)</sup>	Vývojové stádium <sup>2)</sup>	Testováno vzorků (n) <sup>3)</sup>	Pozitivních (n) <i>Cacopsylla</i> univerzální detekce qPCR <sup>4)</sup>	Ø Ct <sup>5)</sup>
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	vajíčka <sup>6)</sup>	7	7	17,84
<i>Cacopsylla pyri</i>		2	2	21,35
<i>Cacopsylla pruni</i>		3	3	21,28
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	nymfa N1–N2 <sup>7)</sup>	10	10	19,13
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N3–N4 <sup>7)</sup>	12	12	16,86
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N5 <sup>7)</sup>	12	12	14,64
<b>Celkem <sup>8)</sup></b>		<b>46</b>	<b>46 (100 %)</b>	

1) Species, 2) Developmental stage, 3) Number of tested samples, 4) Number of positive – *Cacopsylla* universal detection qPCR, 5) Average Ct values, 6) Eggs, 7) Nymph, 8) Total number of samples

Tabulka 5 zobrazuje výsledky detekce vývojových stádií mer způsobujících škody na jabloních (*Cacopsylla melanoneura*, *Cacopsylla mali*, *Cacopsylla picta*). Vajíčka odebraná i s částí listu jabloně v počtu od 3 a více kusů na vzorek a nymfy stáří N1–N2 byly identifikovány jako druh *C. melanoneura* s téměř identickou výslednou průměrnou hodnotou Ct. V tabulce 6 jsou uvedeny výsledky testů dvou specifických identifikačních PCR pro mery, které napadají hrušně (*Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyrisuga*). Z výsledků je zřejmé, že se jednalo u vajíček i nymf N3–N4 a N5 odebraných z výhonů hrušně o druh *C. pyri*. Projevil se i rozdíl v průměrných hodnotách Ct vzorků s 6 kusy vajíček oproti jedné nymfě stádia N3–N4 a N5. Hodnoty Ct byly o 3,44 a 6,05 nižší, což koresponduje s velikostí těla nymfy a vyšší koncentrací izolované DNA. V tabulce 7 jsou evidovány výsledky detekčního systému determinujícího meru, způsobující škody přednostně na dřevinách rodu *Prunus* (*Cacopsylla pruni*). Vajíčka v počtu 10 kusů odebraná z výhonu slivoně byla identifikována jako *C. pruni*. Hodnoty Ct byly srovnatelné s výsledky detekce vajíček rodu *C. pyri*, a pohybovaly se okolo 19. Nižších hodnot Ct, a to o téměř 3 cykly, bylo dosaženo u vajíček druhu *C. melanoneura*.

**Tabulka 5.** Výsledné hodnoty Ct (Cycle threshold) specifických identifikačních systémů pro mery, které se primárně vyskytují na jabloni (*Cacopsylla melanoneura*, *Cacopsylla mali*, *Cacopsylla picta*)

**Table 5.** Ct (Cycle threshold) values for detection systems specific for *Cacopsyllas* feeding primarily on apple trees (*Cacopsylla melanoneura*, *Cacopsylla mali*, *Cacopsylla picta*)

Druh <sup>1)</sup>	Vývojové stádium <sup>2)</sup>	Testováno vzorků (n) <sup>3)</sup>	Specifická real-time PCR (pozitivních; n) <sup>4)</sup>			
			<i>Cacopsylla melanoneura</i>	Ø Ct <sup>5)</sup>	<i>Cacopsylla mali</i>	<i>Cacopsylla picta</i>
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	vajíčka <sup>6)</sup>	7	7 (100 %)	16,66	negativní	negativní
<i>Cacopsylla pyri</i>		2	negativní <sup>9)</sup>		negativní	negativní
<i>Cacopsylla pruni</i>		3	negativní		negativní	negativní
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	nymfa N1–N2 <sup>7)</sup>	10	10 (100 %)	16,47	negativní	negativní
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N3–N4 <sup>7)</sup>	12	negativní		negativní	negativní
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N5 <sup>7)</sup>	12	negativní		negativní	negativní
<b>Celkem <sup>8)</sup></b>		<b>46</b>	<b>17</b>		<b>0</b>	<b>0</b>

1) Species, 2) Developmental stage, 3) Number of tested samples, 4) Specific real-time PCR for - Number of positives, 5) Average Ct values, 6) Eggs, 7) Nymph, 8) Total number of samples, 9) Negative

**Tabulka 6.** Výsledné hodnoty Ct (Cycle threshold) specifických identifikačních systémů pro mery, které se primárně vyskytují na hrušni (*Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyrisuga*)

**Table 6.** Ct (Cycle threshold) values for detection systems specific for *cacopsyllas* feeding primarily on pear trees (*Cacopsylla pyri*, *Cacopsylla pyrisuga*)

Druh <sup>1)</sup>	Vývojové stádium <sup>2)</sup>	Testováno vzorků (n) <sup>3)</sup>	Specifická real-time PCR (pozitivních; n) <sup>4)</sup>			
			<i>Cacopsylla pyri</i>	Ø Ct <sup>5)</sup>	<i>Cacopsylla pyrisuga</i>	Ø Ct
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	vajíčka <sup>6)</sup>	7	negativní <sup>9)</sup>		negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>		2	2 (100 %)	19,20	negativní	
<i>Cacopsylla pruni</i>		3	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	nymfa N1–N2 <sup>7)</sup>	10	negativní		negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N3–N4 <sup>7)</sup>	12	12 (100 %)	15,76	negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N5 <sup>7)</sup>	12	12 (100 %)	13,15	negativní	
<b>Celkem <sup>8)</sup></b>		<b>46</b>	<b>26</b>		<b>0</b>	

Same explanations as in Table 5.

Specifické identifikační PCR systémy potvrdily výskyt 3 druhů mer různých vývojových stádií *C. melanoneura*, *C. pyri* a *C. pruni*, které se nacházely ve výsadbách VŠÚO Holovousy v průběhu jara 2023. Druhovú identita 12 vzorků vajíček byla následně také ověřena sekvenováním úseku COI genu a porovnáním se sekvencemi v databázi. Ve všech případech potvrdilo sekvenování výsledek PCR analýzy. Real-time PCR systémy pro identifikaci mer napadajících ovocné stromy jsou za použitých testovacích podmínek specifické a lze je využít pro spolehlivou molekulární determinaci vajíček a nymf těchto mer. Na základě dosažených výsledků lze však předpokládat, že metoda bude spolehlivá i pro determinaci vajíček a nymf ostatních druhů mer (*Cacopsylla mali*, *C. picta*, a *C. pyrisuga*), které se nepodařilo ve výsadbách nalézt.

**Tabulka 7.** Výsledné hodnoty Ct (Cycle threshold) specifického detekčního systému pro meru *Cacopsylla pruni*, která se primárně vyskytuje na ovocných dřevinách rodu *Prunus*

**Table 7.** Ct (Cycle threshold) values for the detection system specific for *Cacopsylla pruni* feeding primarily on fruit trees of the *Prunus* genus

Druh <sup>1)</sup>	Vývojové stádium <sup>2)</sup>	Testováno vzorků (n) <sup>3)</sup>	Specifická real-time PCR (pozitivních; n) <sup>4)</sup>	
			<i>Cacopsylla pruni</i>	Ø Ct <sup>5)</sup>
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	vajíčka <sup>6)</sup>	7	negativní <sup>9)</sup>	
<i>Cacopsylla pyri</i>		2	negativní	
<i>Cacopsylla pruni</i>		3	3 (100 %)	19,61
<i>Cacopsylla melanoneura</i>	nymfa N1–N2 <sup>7)</sup>	10	negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N3–N4 <sup>7)</sup>	12	negativní	
<i>Cacopsylla pyri</i>	nymfa N5 <sup>7)</sup>	12	negativní	
<b>Celkem <sup>8)</sup></b>		<b>46</b>	<b>3</b>	

Same explanations as in Table 5.

V současné době v praxi probíhá identifikace mer rodu *Cacopsylla* pomocí morfologické metody, která vyžaduje zkušeného entomologa. Problémem je, že i přesto může docházet k chybným identifikacím z důvodů odlišností mezi samci a samičkami a jednotlivými vývojovými stádii. Komplikací také může být, že se u *C. pyri* a dalších druhů mer vyskytuje tzv. sezonní dimorfismus, letní a zimní forma lišící se zbarvením, velikostí a morfologií křídel. Příkladem je studie z roku 2020, která řešila chybné morfologické determinace druhů *Cacopsylla* napadajících hrušně ve východní Asii, Evropě a Íránu pomocí tzv. „DNA barcoding“ analýzy 11 druhů *Cacopsylla* využívající 4 fragmenty mitochondriálních genů (Cho *et al.* 2020). S ohledem na výše uvedené komplikace morfologické identifikace a vzhledem k neexistenci vhodné metody molekulární determinace mer napadajících ovocné dřeviny byly vyvinuty rychlé a přesné metody molekulární determinace na principu real-time PCR univerzálně a specificky detekující spektrum těchto druhů mer běžně se vyskytujících v ovocných výsadbách a školkách (Čmejla *et al.* 2023). V literatuře publikované dosavadní práce molekulární detekce mer ovocných dřevin se týkaly pouze klasické PCR detekce s využitím gelové elektroforézy s následnou UV vizualizací. Specifická detekce hrušňové mery *C. pyricola* a *C. pyri* byla vyvinuta pro účely diagnostiky této mery v zaživacím traktu jejích přirozených predátorů používaných v rámci integrované ochrany rostlin proti škůdcům (Agustí *et al.* 2003). Pro detekci *C. melanoneura* a *C. picta* a dalších 8 druhů *Cacopsylla* vyskytujících se v ovocných sadech byla navržena metoda molekulární identifikace PCR s následnou restriční analýzou zacílená na oblast genu COI (Oetl a Schlink 2015). Nicméně ani jedna z uvedených prací neumožňuje rychlou a spolehlivou rutinní diagnostiku vývojových stádií mer napadajících stromy v ovocných školkách a výsadbách.

## ZÁVĚR

Inovativní molekulární metoda determinace mer rodu *Cacopsylla* založená na real-time PCR umožňuje rychlou druhovou identifikaci vektorových mer přenášejících patogenů



mikroorganizmy 'Candidatus Phytoplasma' spp. skupiny 16SrX v ovocných školkách a výsadbách. Univerzální detekční systém potvrdí přítomnost druhu rodu *Cacopsylla* a doplňující systém specifické identifikace určí, zda se jedná o meru napadající ovocné dřeviny (*C. mali*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pruni*, *C. pyri* a *C. pyrisuga*). V této práci bylo prokázáno, že vyvinutý detekční systém spolehlivě funguje i pro molekulární determinaci vajíčků a nymf všech vývojových stádií 3 druhů rodu *Cacopsylla* (*C. melanoneura*, *C. pruni* a *C. pyri*). Obdobné výsledky lze s vysokou pravděpodobností očekávat i u detekce zbylých druhů mer (*C. mali*, *C. picta* a *C. pyrisuga*).

## PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QK21020395 poskytnutém Ministerstvem zemědělství České republiky. Poděkování patří Lence Křivohlávkové a Lence Tůmové za precizní technickou činnost v laboratoři, taktéž Ing. Michalovi Skalskému, Ph.D. za poskytnutí fotografií vývojových stádií mer.

## LITERATURA

- AGUSTÍ, N., T.R. UNRUH a S.C. WELTER, *Detecting Cacopsylla pyricola (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers*. Online. Bulletin of Entomological Research. 2003, 93(3): 179–185. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/BER2003236>. [citováno 2023-08-10].
- BURCKHARDT, D. *Pictorial key of Central European Cacopsylla species associated with Rosaceae*. Online. In: RLP AgroScience, Neustadt. Dostupné z: <https://www.dlr.rlp.de/Psylliden-english>. [citováno 2023-09-08].
- ČMEJLA, R. a kolektiv. Certifikovaná metodika molekulární determinace vektorových druhů mer napadajících ovocné stromy. *Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.*, 2023. (v tisku).
- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ a R. VRIJENHOEK. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. Online. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994, 3(5): 294–999. PMID: 7881515. [citováno 2023-09-22]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7881515/>.
- CHO, G., I. MALENOVSKÝ, D. BURCKHARDT, H. INOUE a S. LEE. *DNA barcoding of pear psyllids (Hemiptera: Psylloidea: Psyllidae), a tale of continued misidentifications*. Online. Bulletin of Entomological Research. 2020, 110(4): 521–534. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0007485320000012>. [citováno 2023-08-22].
- KOCOUREK, F. a kolektiv. *Integrovaná ochrana ovocných plodin*. Praha: Profi Press s.r.o., 2015. ISBN 978-80-86726-72-4.
- OETTL, S. a K. SCHLINK. *Molecular identification of two vector species, Cacopsylla melanoneura and Cacopsylla picta (Hemiptera: Psyllidae), of apple proliferation disease and further common psyllids of Northern Italy*. Online. Journal of Economic Entomology. 2015, 108(5): 2174–2183. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jee/tov204>. [citováno 2023-09-10].
- RIEDLE-BAUER, M., C. PALESKIĆ, C. SCHÖNHUBER, M. STAPLES a G. BRADER. *Vector transmission and epidemiology of 'Candidatus Phytoplasma pyri' in Austria and identification of Cacopsylla pyrisuga as new pathogen vector*. Online. Journal of Plant Diseases and Protection. 2022, 129(2): 375–386. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00526-y>. [citováno 2023-08-15].

- SKALSKÝ, M. a kolektiv. *Metodika ochrany hrušní proti měře skvrnitě (Cacopsylla pyri)*. Certifikovaná metodika. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., 2018. ISBN 978-80-87030-59-2.
- TEDESCHI, R. a A. ALMA. *Transmission of apple proliferation phytoplasma by Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae)*. Online. Journal of Economic Entomology. 2004, 97(1): 8–13.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jee/97.1.8>. [citováno 2023-10-09].